

ENDOGENE CYTOKININE IN EINER ZELLSUSPENSIONSKULTUR

VON ANIS (PIMPINELLA ANISUM L.)

Dietrich Ernst

Diss. München
1983



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554013_0059

Aus dem Max-Planck-Institut
für Biochemie in Martinsried

ENDOGENE CYTOKININE IN EINER ZELLSUSPENSIONSKULTUR
VON ANIS (PIMPINELLA ANISUM L.)

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie an der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Dietrich Ernst
aus München
1983

Sondergutachter : Prof.Dr.D.Oesterhelt
1.Berichterstatter: Prof.Dr.P.Dittrich
2.Berichterstatter: Prof.Dr.A.Schmidt

Tag der mündlichen Prüfung: 25.7.1983

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Seite

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Phytohormone	1
1.2	Cytokinine	1
1.2.1	Entdeckung	1
1.2.2	Struktur	3
1.2.3	Vorkommen	3
1.2.4	Physiologische Wirkungen	3
1.3	Fragestellung	4
2.	MATERIAL UND METHODEN	6
2.1	Chemikalien	6
2.2	Zellkultur	6
2.2.1	Kulturmedium	6
2.2.2	Isolierung der Zellkultur	7
2.2.3	Subkultur	7
2.2.4	Induktion der Embryogenese	7
2.2.5	Bestimmung der Zelldichte	7
2.2.6	Embryonenzählung	8
2.2.7	Bestimmung des mitotischen Index	8
2.2.8	Zellernte	9
2.3	Extraktion	9
2.3.1	Methode A	9
2.3.2	Methode B	10
2.3.3	Methode C	11
2.4	Hochdruckflüssigkeitschromatographie	11
2.5	Gaschromatographie/Massenspektroskopie	11
2.5.1	Für Isopentenyladenosin und 6-Benzyl-aminopurinribosid	11
2.5.2	Herstellung der TMS-Derivate	12
2.5.3	Erstellung der Eichkurven für SIM - Messungen	12
2.5.4	Für Isopentenyladenin	12
2.5.5	Herstellung der Permethyl-Derivate	12
2.5.6	Erstellung der Eichkurve für SIM - Messungen	13

2.6	Synthese deuteriummarkierter Cytokinine	13
2.6.1	d2-Isopentenyladenosin	13
2.6.2	d2-Isopentenyladenin	14
2.6.3	d2-6-Benzylaminopurinribosid	14
2.7	Amaranthus-Betacyan-Bioassay	15
2.8	Radioimmunoassay	15
2.8.1	Synthese von BSA-Isopentenyladenosin-Konjugaten	15
2.8.2	Synthese von BSA-Zeatinribosid- und BSA-Benzyladenosin-Konjugaten	15
2.8.3	Synthese von ³ H-Cytokinin-Dialkoholen	16
2.8.4	Immunisierung	16
2.8.5	Test	17
2.9	Untersuchungen über ein cytokininbindendes Protein	17
2.9.1	Extraktion	17
2.9.2	Bindungstest	18
2.9.3	Affinitätschromatographie	18
2.10	Allgemeine Methoden	20
2.10.1	Proteinbestimmung	20
2.10.2	SDS-Gel-Elektrophorese	21
2.10.3	Molare Extinktionskoeffizienten von Standardcytokininen	21
3.	ERGEBNISSE	22
3.1	Das Embryogenese-System	22
3.2	Methoden zur quantitativen Bestimmung von Cytokininen	25
3.2.1	Der Bioassay	25
3.2.1.1	Extraktion von Zellen für den Bioassay	27
3.2.1.2	Extraktion verschiedener Embryonalstadien	29
3.2.2	Der Radioimmunoassay	32
3.2.2.1	Antiseren-Charakteristika	32
3.2.2.2	Messungen von Cytokininen im Rohextrakt	35
3.2.2.3	RIA nach einer HPLC	36

3.2.3	Gaschromatographie/Massenspektroskopie	40
3.2.3.1	Eichkurven für Isopentenyladenosin und Isopentenyladenin	41
3.2.3.2	Bestimmung von Isopentenyladenosin und Isopentenyladenin in einer embryonalen und proembryonalen Kultur	45
3.2.3.3	Cytokininanalyse des Mediums	52
3.3	Exogene Applikation von Cytokinin zu der Aniszellkultur	54
3.3.1	Einfluß von Isopentenyladenosin und Isopentenyladenin auf die somatische Embryogenese	54
3.3.2	Einfluß von Cytokinin auf eine proembryonale Kultur	56
3.4	Extraktion und Identifizierung eines neuen, natürlich vorkommenden Cytokinins (6-Benzylaminopurinribosid) in Aniszellkulturen	58
3.5	Cytokininbindendes Protein	63
3.5.1	Bindungstest	63
3.5.2	Affinitätschromatographie	66
4.	DISKUSSION	69
5.	ZUSAMMENFASSUNG	78
6.	LITERATURVERZEICHNIS	80

Abkürzungen

BAP	: 6-Benzylaminopurin
BAR	: 6-Benzyladenosin
BSA	: Rinderserumalbumin
B-5	: Basalmedium (nach Gamborg, 52)
cpm	: Counts/Minute
DMF	: Dimethylformamid
DMSO	: Dimethylsulfoxid
dpm	: Zerfälle/Minute
EDTA	: Ethylendiamintetraacetat
Fg.	: Frischgewicht (= f.wt.)
FID	: Flammenionisationsdetektor
FK	: Fernbachkolben
GA	: Gibberellinsäure
GC/MS	: Gaschromatographie - Massenspektroskopie
HPLC	: Hochdruckflüssigkeitschromatographie
i6Ade	: Isopentenyladenin
i6Ado	: Isopentenyladenosin
io6Ade	: Zeatin
io6Ado	: Zeatinribosid
PVP	: Polyvinylpyrrolidon
Rf	: Laufstrecke der Substanz <u>Distanz Start-Front</u>
RIA	: Radioimmunoassay
rpm	: Umdrehungen/Minute
SDS	: Natriumdodecylsulfat
SIM	: Einzelionen Messung
TCA	: Trichloressigsäure
TEMED	: Tetramethylethylendiamin
TLC	: Dünnschichtchromatographie
TMS	: Trimethylsilyl
Tris	: Tris(hydroxymethyl)aminomethan
V	: Volumen
2,4-D	: 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure

Definitionen:

"splitless injection" (oder stromteilerlose Probenaufgabe)
 Spezielle Technik der Gaschromatographie. Die Technik wird bei hochverdünnten Lösungen eingesetzt, um Spurenkomponenten mit richtiger Säulenbelastung zur Trennung in einer Kapillarsäule zu bringen. Lösungsmittel und uninteressante Hauptkomponenten erreichen dabei die Säule nicht. Das Verfahren läßt sich nur für sehr flüchtige Lösungsmittel oder Hauptkomponenten und für schwerflüchtige Spurenkomponenten in temperaturprogrammierten GC-Systemen anwenden.

"open split"

GC/MS-Kopplungstechnik, bei der keine vakuumdichte Verbindung zwischen MS und GC erforderlich ist (105).

proembryonale Kultur:

Zellkultur in Gegenwart von 2,4-D (= keine Embryogenese).

embryonale Kultur:

Zellkultur in Abwesenheit von 2,4-D (= Embryonalentwicklung)

1. EINLEITUNG

1.1 Phytohormone

Cytokinine gehören neben Auxinen, Gibberellinen, Abscisinsäure und Ethylen zu den 5 Gruppen von Phytohormonen, die in Höheren Pflanzen bis heute bekannt sind. Phytohormone sind definiert als organische Substanzen, die von bestimmten Pflanzengilden produziert werden, in sehr geringen Mengen (bis 10^{-8} M) aktiv sind und spezifische biochemische, physiologische und/oder morphologische Antworten hervorrufen. Der Synthese- und Wirkungsort müssen nicht unbedingt voneinander getrennt sein. Neben den Phytohormonen sind zahlreiche synthetische, chemische Verbindungen bekannt, die wie ein Phytohormon wirken, per definitionem jedoch keines sein können. Dieses Problem wird durch den englischen Ausdruck "plant growth regulator" umgangen, wobei ein Phytohormon ein plant growth regulator ist, ein plant growth regulator jedoch nicht unbedingt ein Phytohormon.

1.2 Cytokinine

1.2.1 Entdeckung

Erste Postulate über die Existenz spezifischer Substanzen, die für die Zellteilung in Pflanzen notwendig sind, stammen von Wiesner (1892) und Haberlandt (1913/1921) (1).

Mit der Entwicklung von Pflanzenzellkulturen begann ein neuer Abschnitt in der Erforschung dieser zellteilungsstimulierender Stoffe. Skoog und Tsui berichteten 1948 über eine Proliferation von Tabakmarkzellen (*Nicotiana tabacum* cv. Wisconsin No.38), wenn die Tabakstielsegmente auf einem auxinhaltigen Medium kultiviert wurden (2). Fehlten in den Stielsegmenten jedoch die Gefäßelemente, so trat keine Zellteilung des Markgewebes ein. Extrakte der Gefäßelemente oder aber Kokosnußmilch, sowie Malzextrakte induzierten wiederum Zellteilungen im Tabakmarkgewebe (3).

Die Cytokinine wurden 1955 entdeckt, als Miller et al. aus autoklavierter Herings-DNA eine Substanz, genannt Kinetin (Abb.1), isolierten, die in Tabakkallus-Kulturen Zellteilungen induzierte (4). Kinetin ist mit 6-Furfurylaminopurin identisch, wie durch chemische Synthese bestätigt wurde (5). Die synthetische Verbindung stimulierte bereits in Konzentrationen $< 5 \times 10^{-9}$ M Zellteilungen in Tabakkallus-Kulturen.

Obwohl Kinetin in Pflanzen selbst nicht vorkommt, wurden

Verbindungen mit ähnlicher Aktivität aus vielen Pflanzen isoliert. Diesen zellteilungsauslösenden Faktoren wurde der Name Cytokinine gegeben (6,7).

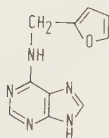


Abb.1. Struktur von Kinetin.

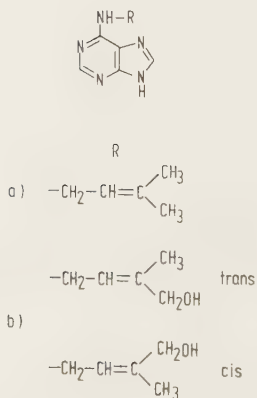


Abb.2. Struktur von Isopentenyladenin (a) und Zeatin (b).

Ein Cytokinin ist definiert als eine Verbindung, die in Gegenwart optimaler Auxinkonzentrationen Zellteilungen in Tabakkallus-Gewebekulturen oder in ähnlichen Gewebekulturen induziert.

Das erste natürlich vorkommende Cytokinin (Zeatin) wurde 1963 von Letham aus unreifen Maiskörnern (Zea mays) isoliert und in der Struktur aufgeklärt (8).

1.2.2 Struktur

Das Grundskelett der Cytokinine ist Adenin, welches in N6-Stellung eine Seitenkette trägt. Diese ist entweder ein Isoprenylrest oder ein aromatischer C₆-Ring. In C-2 Position kann sich eine Methyl- oder Methylthio-Gruppe befinden. Der Kohlenstoff an C-9 kann ribosyliert oder glucosyliert sein. Weiterhin können Glucosylierungen an C-7 des Adenin-Kerns, sowie an C-4 der Seitenkette auftreten. Eine vollständige Übersicht aller natürlicher Cytokinine wurde von Bearder veröffentlicht (9).

Abb.2 zeigt die beiden wichtigsten Vertreter der Cytokinine, Isopentenyladenin (a) und Zeatin (b).

1.2.3 Vorkommen

Hohe Konzentrationen an freien Cytokinin finden sich vor allem in der Wurzelspitze, in jungen Früchten und in Samen (10 - 12). Des weiteren wurden Cytokinine im Xylem- und Phloemsaft, sowie in Blättern nachgewiesen (10 - 15). Aus zahlreichen cytokininautotrophen Zellkulturen konnten Cytokinine isoliert und identifiziert werden (16 - 19). Sehr hohe Cytokininkonzentrationen wurden in mit Agrobacterium tumefaciens infizierten Pflanzen gefunden. Die hierbei auftretenden Konzentrationen sind bis zu 200x größer als in den nichtinfizierten Pflanzen (20).

Cytokinine wurden nicht nur in Höheren Pflanzen, sondern auch in Bakterien, Pilzen, Algen, Moosen und Farnen nachgewiesen (10, 21 - 25, 28).

Das bisher beschriebene Auftreten von Cytokinin bezieht sich auf freie Cytokinine, d.h. nicht an t-RNA gebundene Cytokinine. Hydrolysate von t-RNA aus Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren weisen Cytokinine auf. Isopentenyladenosin kommt wahrscheinlich in der t-RNA aller Spezies vor. Zeatinribosid scheint nur in der Pflanzen t-RNA und zwar in der cis-Konfiguration (Abb.2b) vorzuliegen, wohingegen 2-Methylthio-Isopentenyladenosin bisher nur in Pflanzen und Bakterien nachgewiesen wurde (25, 26).

1.2.4 Physiologische Wirkungen

Die auffallendste physiologische Wirkung der Cytokinine besteht in der Förderung von Zellteilungen in Kallusgeweben (2,27,29). Durch Änderungen des Verhältnisses Cytokinin / Auxin kann eine Differenzierung des Kallus induziert werden. Ein hohes Verhältnis fördert die Wurzelbildung, ein niederes die Sprossbildung (27).

Ähnliche Effekte sind auch in der intakten Pflanze feststellbar. So kann in Stielsegmenten von Avena sativa durch Kinetinapplikation die Ausbildung von Seitenknospen stimuliert, die Bildung von Wurzelanlagen dagegen inhibiert werden. Indolelessigsäure zeigt den gegenteiligen Effekt (30).

Im Zusammenhang mit Zelldifferenzierungsvorgängen ist die verstärkte Bildung von Tracheenelementen aus Parenchymzellen nach Cytokininapplikation (31,32), sowie die Förderung der Chloroplasten-Synthese durch Cytokinine erwähnenswert (33). Die Sexualdifferenzierung einiger Pflanzen scheint Cytokininabhängig zu sein und läßt sich auch durch exogene Applikationen beeinflussen (34). Weiterhin ist die Retardierung der Blattseneszenz auf Cytokinine zurückzuführen (35). Für jederman sichtbar sind im Herbst "grüne Inseln" auf vergilbenden Blättern. Diese weisen einen erhöhten Cytokiningehalt, bedingt durch die Anwesenheit von Parasiten, auf. Schließlich fungieren Cytokinine, wie auch Gibberellinsäuren als Gegenspieler zu endogenen Keimhemmungsstoffen bei der Samenkeimung (36,37,38).

1.3 Fragestellung

Über eine mögliche Beteiligung endogener Cytokinine an der Embryogenese und damit an der Ausdifferenzierung von nichtdifferenzierten Zellen ist bis heute wenig bekannt. Lorenzi et al.(39), sowie Smith und Van Staden (40) berichteten über unterschiedliche Cytokininkonzentrationen im Embryo und Endosperm. Zeatin (10^{-8} bis 10^{-5} M) soll das Längenwachstum in Phaseolus coccineus Embryonen fördern, die, befreit von ihrem Endosperm, in vitro kultiviert wurden (44).

Exogen applizierte Cytokinine können die Ausbildung von Embryos aus in vitro kultivierten Karottenzellen beeinflussen. Von mehreren Cytokinin bewirkte lediglich Zeatin in einer Konzentration von 10^{-7} M eine Steigerung der Embryobildung; höhere Konzentrationen wirkten inhibitorisch, wie es auch bei anderen Cytokinin beobachtet wurde (41,42).

Über Veränderungen des endogenen Cytokininspiegels während der Embryonalentwicklung einer cytokininabhängigen Selleriekultur wird von Al-Abta berichtet (61). Inwieweit Cytokinine direkt an embryonalen Ausdifferenzierungsprozessen und nicht nur an Zellteilungsvorgängen beteiligt sind, war jedoch noch nicht bekannt.

Zur Klärung dieser Frage eignen sich besonders cytokinin-autotrophe Zellkulturen, die auch zur Embryogenese induziert werden können. Hierbei sind Suspensionskulturen den Kalluskulturen vorzuziehen, da sie eine wesentlich kürzere Generationszeit und bessere Reproduzierbarkeit morphologischer Merkmale aufweisen (52). Besonders geeignet zur Induktion der somatischen Embryogenese sind Suspensionskulturen von Daucus carota (41,42,52,57,58). Ebenfalls zur

Familie der Umbelliferae gehört die in dieser Arbeit untersuchte cytokininautotrophe Aniszellkultur (Pimpinella anisum). In Gegenwart von 2,4-D ist in dieser Kultur, wie auch in anderen Systemen (41,42,53,96), die Embryogenese unterdrückt. Durch Entzug dieses synthetischen Auxins entstehen aus undifferenzierten Zellen zunächst globuläre, dann herzförmige, schließlich torpedoförmige Embryonen und Keimlinge. Dieser Vorgang ist unabhängig von exogenen Hormonen. Endogene Cytokinine, deren Strukturen nicht bekannt sind (43), und Gibberelline (69) konnten in einer Aniszellkultur bereits nachgewiesen werden. Inwieweit sie jedoch an der somatischen Embryogenese beteiligt sind, war nicht bekannt.

Die quantitative Messung von Cytokinen ist für das Verständnis ihres Wirkungsmechanismus notwendig. Für die Identifizierung und Quantifizierung von Cytokinen gibt es drei Haupttechniken: 1) den Biotest, 2) den RIA und 3) die GC/MS in Verbindung mit SIM-Messungen.

Da der biologische Test eine aufwendige und zeitraubende Vorreinigung, zur Entfernung von Störfaktoren erfordert, sowie unspezifisch ist, wurde auch ein RIA auf Grund seiner Empfindlichkeit und kürzeren Zeitdauer für die Cytokinbestimmung eingesetzt. Durch den Aufbau eines GC/MS-Systems mit SIM-Messungen konnte eine eindeutige Strukturzuordnung von Cytokinen, in Verbindung mit einer hohen Empfindlichkeit, erreicht werden.

Neben dem Nachweis von Cytokinen der Isopentenyladenin- und Zeatin-Gruppe, wurde im Verlauf der Untersuchung ein neues natürliches Cytokinin (6-Benzylaminopurinribosid), extrahiert und identifiziert. 6-Benzylaminopurinribosid war bisher nur als synthetischer "plant growth regulator" bekannt.

Weiterhin konnte in dieser Zellkultur eine cytokininbindende 80.000 x g Zell-Fraktion nachgewiesen werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien

Sämtliche Pflanzenhormone wurden von Sigma (München) bezogen. Die Vorstufen für die Synthese der deuterierten Cytokinine waren von Fluka (Neu-Ulm). Cellulose Phosphat P11 war von Whatman (Maidstone), Sephadex LH-20, G-25 und Sepharose 4B von Pharmacia (Uppsala), die Filterpapiere von Sartorius (Göttingen). Alle anderen Chemikalien waren, soweit nicht anders vermerkt, von Merck (Darmstadt).

2.2 Zellkultur

2.2.1 Kulturmedium

B5 Medium nach Gamborg (52)

Verbindung	mg/1000 ml

MnSO ₄ x H ₂ O	10
H ₃ BO ₃	3
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	2
KJ	0,75
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,025
KNO ₃	2.500
MgSO ₄ x 7H ₂ O	250
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	150
CaCl ₂ x 2H ₂ O	150
(NH ₄) ₂ SO ₄	134
Fe-330	
(Ciba-Geigy)	28
Saccharose	20.000
Nicotinsäure	1
Thiamin x HCl	10
Pyridoxin x HCl	1
Myo-Inositol	100

Der pH wurde vor dem Autoklavieren (30 min.) mit 0,2 N KOH auf 5,5 eingestellt.

Modifikationen:

- + 2,4-D Medium: B5 Medium mit 2,4-D (1mg/1000 ml).
- Agarmedium: 8g Agar (Difco) auf 1000 ml B5.

2.2.2 Isolierung der Zellkultur (An 180)

a) *Pimpinella anisum* L. Samen wurden für 2 min. mit Ethanol/Wasser (70:30) behandelt, die alkoholische Lösung wurde entfernt und die Samen für 15 min. mit 2%iger Natriumhypochlorid-Lösung gewaschen. Die Samen wurden mehrmals mit Wasser (bidest.) gespült und im Dunkeln auf Filterpapier mit Wasser (bidest.) inkubiert. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

b) nach der Keimung wurden Hypokotylsegmente der etiolierten Aniskeimlinge auf +2,4-D B5 Agarmedium gebracht und im Dunkeln bei 27 °C für 8 Wochen inkubiert. Das entstandene weiße Kallusgewebe wurde auf +2,4-D B5 Medium übertragen und weiter kultiviert (Bedingungen wie unter 2.2.3). Nach weiteren 8 Wochen Subkultivierung war eine Zellsuspension entstanden, welche aus Einzelzellen und Zellaggregaten bestand und zur Embryogenese induziert werden konnte.

2.2.3 Subkultur

Routinemäßige Subkultur erfolgte alle 4-5 Tage in 50 ml +2,4-D B5-Medium (Verdünnung 1:10). Die Zellkultur wurde in 250 ml Delong-Kolben auf einem Rundschüttler (140 rpm) unter Dauerlicht (1000 Lux Neon-Weißlicht, verstärkt durch Fluora-Leuchtstoffröhren; Osram) bei 27 °C gehalten. Größere Kulturansätze wurden mit 1,8 l Fernbach-Kolben durchgeführt.

2.2.4 Induktion der Embryogenese

Die Zellsuspension wurde für 2 min. bei 1 x g sedimentiert und der Überstand abdekantiert. Anschließend wurde für 10 min. mit B5-Medium gewaschen (140 rpm). Die Zellen wurden wiederum sedimentiert, das Medium abdekantiert und mit frischem B5-Medium für 2 h gewaschen (140 rpm). Die Zellsuspension wurde über ein 400 µm Stahlsieb gefiltert, dann das Filtrat sedimentiert, das Medium abdekantiert und die Zellen mit frischem B5-Medium versetzt. Die gesiebte Zellsuspension wurde auf 1,8 l Fernbach-Kolben oder auf Petrischalen (94x16 mm; 60x15 mm) verteilt, wobei eine Anfangszelldichte von ca. 10⁵ Zellen/ml eingestellt wurde.

Inkubationsbedingungen: Rundschütteln (60 rpm) bei 1000 Lux und 27 °C.

2.2.5 Bestimmung der Zelldichte (53)

5 ml der gut gemischten Suspension von Zellen und Zellaggregaten (oder Embryonen) wurden mit 1 ml 90%iger TCA versetzt und 20 min. stehen gelassen. Anschließend wurde in einem Potter vorsichtig homogenisiert, so daß Einzelzellen und kleine Zellaggregate (2-10 Zellen / Aggregat) entstanden. Das Homogenat wurde für 5 min. bei 100 x g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und der Niederschlag

mit 15%iger TCA auf ein geeignetes Volumen aufgefüllt. Die Zellzählung erfolgte mit einem Hämacytometer.

Formel zur Berechnung der Zelldichte:

$$\frac{\text{Zahl der Zellen} \times V \text{ (TCA-Homogenat)} \times 10^4}{n \text{ Zählkammern} \times V \text{ (Zellsuspension)}} = \text{Zellen/ml}$$

2.2.6 Embryonenzählung

Die Auszählung der Embryos erfolgte unter dem Mikroskop bei 25-40x facher Vergrößerung nach morphologischen Gesichtspunkten : globulär, herzförmig, torpedoförmig (siehe Abb.7).

2.2.7 Bestimmung des mitotischen Index (43)

Der TCA-Niederschlag (siehe 2.2.5) wurde mit 4 ml Fixierlösung (Essigsäure/96% Ethanol, 3:1) versetzt und 1,5 h stehen gelassen. 1 Tropfen dieses Sediments wurde auf einen Objektträger gebracht, die Fixierlösung wurde abgesaugt und 1 Tropfen Carbofuchsinlösung (33%) zugesetzt. Mit einem Glasstab wurde die Suspension verrieben, nach weiteren 3 min. mit einem Deckglas bedeckt und für 5 min. auf 70 °C erwärmt. Anschließend konnten durch vorsichtiges Quetschen mit einer Gummirolle die Chromosomen ausgebreitet werden. Die Chromosomen waren dunkelrot, die Zellkerne dagegen nur schwach rosa gefärbt. Für die Ermittlung des mitotischen Index wurden mindestens 1000 Zellen ausgezählt. Als Kriterium für die Mitose wurde die späte Prophase bis einschließlich der Telophase herangezogen.

Formel zur Berechnung des mitotischen Index (MI):

$$\frac{\text{Anzahl der Zellen in Mitose} \times 100}{\text{Zahl der ausgezählten Zellen}} = \text{MI} (\%)$$

 * (Herstellung der Carbofuchsinlösung:
 Lösung A: 3 g basisches Fuchsin in 1000 ml Ethanol/Wasser (70:30) lösen. Lösung B: 10 ml Lösung A + 90 ml Phenol/Wasser (5:95). Lösung C: 45 ml Lösung B + 6 ml Eisessig + 6 ml Formaldehyd/Wasser (37:63). Carbofuchsin (33 %): 33 ml Lösung C + 67 ml Eisessig).

2.2.8 Zellernte

Die Zellen (Embryonen) wurden für 10 min. bei 1 x g sedimentiert, mit B5 Medium gewaschen und 2 min. bei 100 x g zentrifugiert. Der Zellsniederschlag wurde nach Ermittlung des Frischgewichts mit flüssigem Stickstoff eingefroren und weiter aufgearbeitet, bzw. bis zur Extraktion bei -25 °C aufbewahrt.

Das Medium wurde gefiltert (Glasfritte 3D) und anschließend lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde ebenfalls bis zur Extraktion bei -25 °C gelagert.

2.3 Extraktion

2.3.1 Methode A

Aufschluß: die Zellen (bis zu 200 g) wurden mit eiskaltem Methanol (Endkonzentration 80 %) im Labormixer (Waring Commercial Division, Modell CB-6) homogenisiert und 20 h bei 4 °C gerührt. Nach Papierfiltration wurde der Rückstand nochmals für 4 h bei 4 °C mit Methanol/Wasser (80:20) extrahiert und anschließend wieder filtriert.

Die Filtrate wurden vereinigt und das Methanol bei 40 °C unter reduziertem Druck verdampft. Die wässrige Phase wurde mit Essigsäure ad pH 3,5 gebracht, mit PVP (0,1 g/g Fg.) versetzt und 30 min. lang gerührt, bevor die Suspension filtriert und der Rückstand mit verdünnter Essigsäure (pH 3,5) nachgewaschen wurde. Die vereinigten Filtrate wurden mit Essigsäure auf pH 3,1 eingestellt.

Cellulosephosphat-Säulenchromatographie (NH₄⁺-Form, 2 ml Säulenvolumen/g Fg., Detektion bei 254nm, Flußrate: 20ml/h): nachdem das PVP-Filtrat aufgetragen worden war, wurde die Säule mit 5 Säulenvolumen verdünnter Essigsäure gewaschen (pH 3,1). Dieses Waschvolumen ergab die Fraktion A.

Die Säule wurde anschließend mit 2N NH₄OH-Lösung eluiert (5 x Säulenvolumen). Das Elutionsvolumen wurde als Fraktion B bezeichnet.

Aufarbeitung der Fraktion A:

Die Fraktion wurde am Rotationsverdampfer zur Trockene gebracht und der Rückstand in 0,1 M Tris-Puffer pH 9,5, der 0,01 M MgCl₂ enthielt, gelöst. Nach Zugabe von alkalischer Phosphatase Type I (SIGMA) (0,5 mg/g Fg.) wurde für 24 h bei 37 °C inkubiert und die Reaktion dann durch Zugabe von Ethanol (Endkonzentration 50 %) gestoppt. Nach Papierfiltration wurde das Ethanol evaporiert, der wässrige Rückstand mit 2 N HCl ad pH 8 gebracht und 3 x mit wassergesättigtem n-Butanol (das Volumen entsprach jeweils dem Volumen des wässrigen Rückstandes) ausgeschüttelt. Die Wasserphase wurde verworfen, die Butanol-Phasen vereinigt und bei 40 °C am Rotationsverdampfer eingedampft. Der Rückstand wurde in Methanol gelöst, über Glaswolle filtriert und strichförmig auf Whatman 3MM Chromatographierpapier aufgetragen.

Papierchromatographie (Whatman 3MM, Fließmittel: Propanol(-2) / 25% NH_4OH / Wasser (10:1:1), Laufstrecke 20 cm). Nach dem Trocknen wurde das Chromatogramm in 2 cm Abschnitte unterteilt, welche dann direkt im Amaranthus-Bioassay auf ihre Cytokinaktivität getestet wurden. Aktive Rf-Bereiche wurden mit Methanol/Wasser (80:20) eluiert. Das Eluat wurde evaporiert, der Rückstand in wenig Wasser gelöst und im RIA quantitativ erfaßt.

Aufarbeitung der Fraktion B:

Der Ammoniak wurde evaporiert, die zurückbleibende wässrige Phase wurde mit KOH auf pH 8 eingestellt und 5x mit wassergesättigtem n-Butanol (das Volumen entsprach jeweils dem Volumen der wässrigen Phase) ausgeschüttelt. Die Wasser-Phase wurde verworfen und die vereinigten Butanol-Phasen bei 40 °C unter reduziertem Druck zur Trockene gebracht. Der Rückstand wurde in 2 ml Ethanol/Wasser (35:65) gelöst, über Glaswolle filtriert und auf einer Sephadex LH-20 Säule chromatographiert.

Sephadex LH-20 Säulenchromatographie (26 x 2 cm, bzw. 65 x 1,6 cm, Elutionsmittel Ethanol/Wasser (35:65), Flußrate 20 ml/h, Detektion bei 254 nm): es wurden 30 ml Fraktionen gesammelt, die dann im Bioassay getestet wurden.

Bei GC/MS und SIM-Messungen wurden die entsprechenden Co-Elutionsbereiche der einzelnen Cytokine direkt weiter untersucht (siehe unter 2.5).

2.3.2 Methode B

Das Zellmaterial (bis zu 5 g) wurde im Labormixer (Waring Commercial Division) mit eiskaltem Methanol (Endkonzentration 80 %) homogenisiert und für 20 h bei 4 °C gerührt. Anschließend wurde zentrifugiert (15 min. bei 3.600 x g). Der Niederschlag wurde nochmals mit Methanol/Wasser (80:20) bei 4 °C für 4 h extrahiert und wieder zentrifugiert. Die vereinigten Überstände wurden evaporiert (40 °C) und die zurückbleibende wässrige Phase (1-1,5 ml) zentrifugiert (10.000 x g, 20 min.).

a) der Überstand wurde direkt oder nach geeigneter Verdünnung im RIA getestet.

b) der Überstand wurde auf eine Sep-Pak-C18 Säule (Waters Associates, Königstein) gegeben, die dann mit Wasser (20 ml) gewaschen und mit Methanol (10 ml) eluiert wurde. Das Elutionsmittel wurde evaporiert und der Rückstand erneut in Methanol gelöst (0,5 ml). Die Lösung wurde durch ein 0,2 µm Aerodisc-Filter (Gelman Science, Michigan) filtriert und auf einer HPLC-Säule chromatographiert (siehe unter 2.4). Es wurden 4 ml Fraktionen gesammelt, das Elutionsmittel lyophilisiert, der Rückstand in Wasser (0,5 ml) gelöst und schließlich Aliquote davon im RIA getestet.

2.3.3 Methode C

Das Zellmaterial (bis zu 10 g) wurde im Labormixer (Waring Commercial Division) mit eiskaltem Methanol (Endkonzentration 80%) homogenisiert, die deuterierten Cytokinine zugegeben und die Mischung für 20 h bei 4 °C gerührt. Nach Filtration (200 µm Zellulose-Vorfilter, Sartorius) wurde der Rückstand mit Methanol/Wasser (80:20) reextrahiert (4 h, 4 °C) und filtriert. Aus den vereinigten Filtraten wurde das Methanol durch Evaporation bei 40 °C entfernt und der wässrige Rückstand zentrifugiert (10.000 x g, 20 min.). Nach Filtration des Überstandes (200 µm Glasfaserfilter, dann 0,2 µm Zelluloseacetat-Filter; Sartorius) wurde das Filtrat über Sep-Pak-C18 Kurzsäulen (Waters Associates, Königstein) chromatographiert. Die Säulen wurden mit Wasser (30 ml) gewaschen und mit Methanol (20 ml) eluiert. Das Methanol-Eluat wurde zur Trockene gebracht, der Rückstand in wenig Methanol gelöst (0,3-0,4 ml), filtriert (0,2 µm Acrodisc-Filter; Gelman Science, Michigan) und auf einer HPLC-Säule chromatographiert (siehe unter 2.4). Elutionsbereiche authentischer Cytokinine wurden auf derselben Säule rechromatographiert. Cytokininhaltige Fraktionen wurden zu einem kleinem Volumen am Rotationsverdampfer eingeeengt, mit einem Stickstoffstrom bei 37 °C zur Trockene gebracht und wie unter "GC/MS" beschrieben weiter aufgearbeitet.

2.4 Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Zur Trennung der Cytokinine wurde eine 5µm Lichrosorb RP8 Säule (250 x 4,6 mm) (Bischoff, Leonberg) verwendet. Die Detektion erfolgte bei 268 nm mittels eines Shimadzu UV-Monitors. Das Elutionsmittel war Wasser/Acetonitril (70:30) 0,5% Essigsäure enthaltend. Die Durchflußrate lag bei 2 ml/min. (Gynkotek Pumpe).

2.5 Gaschromatographie/Massenspektroskopie

2.5.1 Für Isopentenyladenosin und 6-Benzylaminopurinribosid

Für GC/MS Messungen wurde ein Carlo Erba Gaschromatograph, Modell 2110 (Mailand) eingesetzt. Trennungen wurden mit einer 25 m Silica-Kapillarsäule (i.d. 0,32 mm), beschichtet mit CPT^m-Sil5 (Chrompack, Berlin) erreicht. Die Injektion war "splitless" für 1 min. bei 150 °C Ofentemperatur. Das Trägergas war Wasserstoff mit einer Flußrate von 1,5 ml/min., die Ofentemperatur wurde während des Chromatogramms von 150 °C auf 280 °C bei einer Rate von 5 °C/min. gesteigert.

Für GC/MS und SIM-Messungen wurde ein analoger Gaschromatograph mit einem Varian CH7A Massenspektrometer (Bremen) durch einen "open split" verbunden. Das System war direkt an

das Datensystem Varian SS200 MS angeschlossen. Als Trägergas wurde Helium (1,8 ml/min.) eingesetzt.

Messungen der Peak-Flächen-Verhältnisse wurden mittels der SIM-Software von Varian MAT für das Datensystem SS200 durchgeführt.

2.5.2 Herstellung der TMS-Derivate

Standards, bzw. getrocknete Probenfraktionen, wurden in Ethanol/Wasser (35:65) gelöst und in Portionen aufgeteilt. Diese wurden in Reacti Vials (Antech, Bad Dürkheim) überführt und mittels eines Speed Vac Concentrators (Modell SVC 100H, Savant, New York) getrocknet. Zu Proben (2-5 μ l), die 10-400 ng Cytokinin/ μ l in Acetonitril enthielten, wurden 2-5 μ l Hexamethyldisilazan/Trimethylchlorasilan/Pyridin (2:1:10) gegeben und nach Mixen für 30 min. in mit Teflonkappen verschlossenen Reacti Vials bei 90 °C gehalten. Nach dem Abkühlen wurde die Mischung zentrifugiert und 0,5 - 2 μ l des Überstands gaschromatographiert.

2.5.3 Erstellung der Eichkurven für SIM-Messungen

a) Isopentenyladenosin: Standardlösungen von Isopentenyladenosin (11,6 ng/ μ l) und d2-Isopentenyladenosin (48,0 ng/ μ l) in Acetonitril wurden so gemischt, daß sich ein Verhältnis Isopentenyladenosin/d2-Isopentenyladenosin von 0,1-8,0 ergab. Die Cytokininkonzentration wurde durch Zugabe von Lösungsmittel auf 5-50 ng/ μ l eingestellt. 2-5 μ l dieser Mischung wurden trimethylsilyliert und gaschromatographiert.

b) 6-Benzylaminopurinribosid: Standardlösungen von d2-Benzyladenosin (190 ng/ μ l) und Benzyladenosin (265 ng/ μ l) in Acetonitril wurden so gemischt, daß das Verhältnis Benzyladenosin/d2-Benzyladenosin im Bereich von 0,17-9,77 lag. Durch Zugabe von mehr Lösungsmittel wurde ein Cytokiningehalt von 4-38 ng/ μ l eingestellt. Von dieser Mischung wurden 2-5 μ l mit demselben Volumen an Silylierungsmittel trimethylsilyliert und gaschromatographiert.

2.5.4 Für Isopentenyladenin

Die Trennungen wurden mit einer 10 m Silica-Kapillarsäule (i.d. 0,32 mm), beschichtet mit CPtm-Sil5, durchgeführt. Die Injektion war "splitless" für 1 min. bei 80 °C. Die Ofentemperatur wurde von 80 °C auf 190 °C bei einer Rate von 10 °C/min. gesteigert. Alle anderen Bedingungen entsprachen den Messungen für Isopentenyladenosin, bzw. Benzyladenosin.

2.5.5 Herstellung der Permethyl-Derivate (nach Martin, 81)

Standards, bzw. getrocknete Proben, die 30-228 ng Cytokinin* enthielten, wurden zuerst mit 10 μ l Dimethylsulfinyl-Anion in DMSO und dann mit 10 μ l Methyljodid versetzt. Nach 30 min. wurden 10 μ l Wasser, dann 20 μ l Chloroform zugegeben und gemischt. Nach Zentrifugation (Beckmann Minifuge) wurde die Oberphase entfernt, die Unterphase mit

10 μ l Wasser gewaschen, zuerst im Speed Vac Concentrator , schließlich über P_2O_5 getrocknet. Der in Chloroform gelöste Rückstand wurde gaschromatographiert.

2.5.6 Erstellung der Eichkurve für SIM-Messungen

Standardlösungen von Isopentenyladenin (252,5 ng/ μ l) und d2-Isopentenyladenin (557,5 ng/ μ l) in Acetonitril wurden so gemischt, daß sich ein Verhältnis Isopentenyladenin/d2-Isopentenyladenin von 0,5-8,0 ergab. Durch Zugabe von mehr Acetonitril wurde die Cytokininkonzentration auf 3-22,8 ng/ μ l eingestellt. 10 μ l der Mischung wurden in Reacti-Vials (Antech, Bad Türkheim) getrocknet, permethyliert und gaschromatographiert.

*-----
(90 mg Kalium tert.butylat und 3 ml DMSO getr. wurden für 30 min. bei 45 °C gerührt; die Lösung wurde in kleine Vials verteilt, welche abgeschmolzen und bei -20 °C aufbewahrt wurden).

2.6 Synthese deuteriummarkierter Cytokinine

2.6.1 d2-Isopentenyladenosin

a) Synthese von d2-3-Methyl-2-butenylamin

Die Reduktion von 3,3-Dimethylacrylnitril mit $LiAlD_4$ zu d2-3-Methyl-2-butenylamin erfolgte ähnlich der Beschreibung von Schröter (46):

zu 0,09 Mol $LiAlD_4$ (Fluka) in 200 ml Ether wurden langsam 0,07 Mol 3,3-Dimethylacrylnitril (Fluka) in 30 ml Ether unter Rühren zugetropft. Nach weiteren 30 min. bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 2,5 ml Wasser und 50 ml 10%igem Natriumhydroxid gestoppt. Die Etherphase wurde abdekantiert und der Rückstand mit Ether ausgewaschen (4 x 20 ml). Die vereinigten Etherphasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und nach Absieden des Ethers destilliert. Das d2-Amin wurde im Bereich von 100-150 °C (Lit.¹⁰⁴ 110 °C) gewonnen und seine Reinheit durch NMR-Messungen kontrolliert ($-NH_2$ 2,5; $-CH_2-$ 3,18 (fehlte bei $-CD_2-$); $-CH_3$ 1,66; $-CH_3$ 1,57).

*-----
(Bestimmung der Reaktionsdauer: Eine 20 %ige Kaliumcarboxynatlösung wurde 5 x mit dem gleichen Volumen an Chloroform ausgeschüttelt und die vereinigten Chloroformphasen als Reagenzlösung A bezeichnet. Reagenzlösung B: 0,425 g $Cu(II)Cl_2$ wurden in 50 ml Ethanol gelöst. Durchführung: 5 ml der Probelösung + 1 g K_2CO_3 + 5 ml Reagenz A wurden für 1 min. gut geschüttelt. 1 ml dieser Lösung wurde mit 5 ml Reagenz B versetzt und mit Ethanol auf 25 ml aufgefüllt. Die Extinktion bei 860 nm, gemessen gegen einen Blindwert, diente als Maßstab für vorhandenes alipathisches Amin).

b) Synthese von d2-Isopentenyladenosin

0,6 mMol d2-3-Methyl-2-butenylamin und 0,3 mMol 6-Chlorpurinribosid (Sigma) wurden in 6 ml n-Butanol für 2h am Rückfluß gekocht, dann am Rotationsverdampfer bei 40 °C zur Trockene gebracht und der Rückstand aus Ethanol kristallisiert.

Das entstandene Produkt war dünnschichtchromatographisch (Merck Silicagel 60, R_f : 0,59; Fließmittel: n-Butanol/Essigsäure/Wasser, 12:3:5, 254nm), sowie bezüglich der NMR- und MS-Daten identisch mit einer authentischen Probe von Isopentenyladenosin, mit Ausnahme der deuteriummarkierten Stellen. (NMR-Daten: $-\text{CH}_3$ 1,71; $-\text{CH}=$ 5,33; $-\text{CH}_2-$ 4,15 (fehlte bei $-\text{CD}_2-$); $-\text{NH}-$ 7,89; H-Purinyl 8,33 und 8,21; H-Ribosyl 3,6 bis 4,6; anomeres H 5,98. Massendaten siehe Abb.16).

2.6.2 d2-Isopentenyladenin

2 mMol d2-3-Methyl-2-butenylamin und 1 mMol 6-Chlorpurin (Fluka) wurden in 19 ml n-Butanol für 2h unter Rückflußkühlung gekocht, dann im Rotationsverdampfer getrocknet und der Rückstand aus Ethanol kristallisiert. Das Produkt war identisch mit authentischem Isopentenyladenin, mit Ausnahme der deuteriummarkierten Stellen. (Dünnschichtchromatographie wie oben, Rf: 0,63. NMR-Daten: $-\text{CH}_3$ 1,70; $-\text{CH}_2=$ 5,32; $-\text{CH}_2-$ 4,12 (fehlte bei $-\text{CD}_2-$); $-\text{NH}-$ 7,64; H-Purinyl 8,20 und 8,09. Massendaten siehe Abb.18).

2.6.3 d2-6-Benzylaminopurinribosid

a) Reduktion von Benzonitril mit LiAlD₄ zu d2-Benzylamin

Zu 0,1 Mol LiAlD₄ (MSD, München) in 200 ml Ether wurden unter laufender Kühlung 0,1 Mol Benzonitril (Fluka) in 20 ml Ether zugetropft. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4 ml Wasser und 3 ml 20%igem Natriumhydroxid beendet. Anschließend wurden noch weitere 14 ml Wasser zugegeben. Der Ether wurde abdekantiert und der Rückstand mit Ether extrahiert (4 x 50 ml). Die vereinigten Etherphasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, der Ether abgezogen und der Rückstand destilliert. Das Produkt siedete im Bereich von 184 °C (Lit. 185 °C). NMR-Daten: $-\text{NH}_2$ 2,5; $-\text{CH}_2-$ 3,78 (fehlte bei $-\text{CD}_2-$); Benzylring 7,27.

b) Synthese von d2-Benzyladenosin

1,2 mMol d2-Benzylamin und 0,6 mMol 6-Chlorpurinribosid (Sigma) wurden in 12 ml n-Butanol am Rückfluß für 1h gekocht. Nach Verdampfen des Butanols bei 40 °C unter reduziertem Druck wurde der Rückstand aus Ethanol kristallisiert. Eine Überprüfung der Identität und Reinheit erfolgte entsprechend wie für d2-Isopentenyladenosin (TLC, Rf: 0,59. NMR-Daten: Benzylring 7,13; $-\text{CH}_2-$ 4,7 (fehlte bei $-\text{CD}_2-$); H-Purinyl 8,40 und 8,20; anomeres H 5,91; H-Ribosyl 3,6 bis 4,6. Massendaten: m/e 575, 560, 485, 349, 348, 259, 256, 243, 230, 226, 217, 108, 93).

2.7 *Amaranthus*-Betacyan-Bioassay (43,45)

(Der Test wurde unter grünem Sicherheitslicht durchgeführt). *Amaranthus caudatus* Samen (Fa. Walz, Stuttgart) wurden auf 2 Lagen befeuchtetem Filterpapier für 96 h im Dunkeln inkubiert. Nach Entfernung der Samenhülle wurden Explantate, bestehend aus den Kotyledonen und dem oberen Abschnitt des Hypokotyls in Petrischalen überführt und 24 h bei 27 °C im Dunkeln inkubiert. Inkubationsbedingungen: Standardcytokinine, bzw. getrocknete Proben wurden in 2 ml 0,013 M Phosphatpuffer pH 6,3 enthaltend 1 mg L-Tyrosin/ml gelöst und in Petrischalen (60 x 16 mm), die 2 Lagen Filterpapier enthielten, überführt. Rf-Bereiche von Papierchromatogrammen wurden direkt in den Petrischalen nach Zugabe der Pufferlösung getestet. Die Explantate wurden anschließend in Zentrifugenröhrchen mit 3 ml Wasser eingefroren, bei Zimmertemperatur wieder aufgetaut, nochmals eingefroren und erneut aufgetaut. Als Maßstab für die Menge des so extrahierten Betacyans wurde die Differenz der Extinktion von 542 nm und 620 nm eingesetzt. Zur Bestimmung für eine Cytokininaktivität dienten Kontrollmessungen, durchgeführt ohne zugesetztes Cytokinin, deren Extinktionsdifferenz auf 100% festgesetzt wurde.

2.8 Radioimmunoassay

2.8.1 Synthese von BSA-Isopentenyladenosin-Konjugaten (nach Weiler, 20)

Zu 30 μ Mol Isopentenyladenosin in 2 ml Methanol wurden unter Rühren tropfenweise 5 ml 0,01 M NaJO_4 -Lösung (Sigma) zugegeben. Nach weiteren 20 min. wurde die Oxidation von Isopentenyladenosin durch Zugabe von 0,3 ml 0,1 M Ethylenglykol beendet und anschließend noch 5 min. gerührt. Kopplung mit BSA (Sigma): die oxidierte Cytokininlösung wurde tropfenweise mit 5 ml BSA-Lösung (23 mg/ml, mit 5%igem K_2CO_3 auf pH 9,3 eingestellt) versetzt und für 1 h bei pH 9,3 gehalten. Die Reduktion der Aldehyd-Gruppen erfolgte innerhalb von 1,45 h durch Zugabe von NaBH_4 , zunächst 5,7 mg, dann 5,1 mg. Der pH wurde anschließend mit 1M Essigsäure auf 6,3 eingestellt, um überschüssiges NaBH_4 zu zerstören. Durch Dialyse gegen Wasser wurde noch vorhandenes freies Isopentenyladenosin entfernt. (Kopplungsverhältnis BSA/Isopentenyladenosin, 1:4,9).

2.8.2 Synthese von BSA-Zeatinribosid- und BSA-Benzyladenosin-Konjugaten

Die Herstellung erfolgte entsprechend der Synthese von BSA-Isopentenyladenosin-Konjugaten (Kopplungsverhältnisse BSA/Zeatinribosid, 1:2,8 und BSA/Benzyladenosin, 1:5,7).

2.8.3 Synthese von ^3H -Cytokinin-Dialkoholen (abgeändert nach Weiler, 20)

a) Oxidation von Benzyladenosin

10 μMol Benzyladenosin wurden in 0,5 ml Methanol gelöst. Innerhalb von 5 min. wurden 25 μMol NaJO_4 (in 2,5 ml Wasser) zugetropft, nach weiteren 15 min. wurde die Oxidation von Benzyladenosin durch Zugabe von 0,1 ml 0,1 M Ethylenglykol innerhalb von 7 min. beendet. Die Reinigung des Dialdehyds erfolgte durch eine Dünnschichtchromatographie auf Merck-Kieselgelfolien 60: Fließmittel: Chloroform/Methanol, 9:2. Der R_f -Bereich um 0,53 wurde mit Methanol eluiert, das Eluat evaporiert und der Rückstand in 1 ml Methanol gelöst.

b) Reduktion des Dialdehyds mit ^3H -NaBH₄

350 μl Benzyladenosin-Dialdehyd-Lösung (0,3 μMol) wurden mit Stickstoff zur Trockene gebracht, in 20 μl Methanol gelöst und 100 μl 1M $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ Puffer (pH 9,3) zugefügt. ^3H -NaBH₄ (100 mCi; 8,5 Ci/mMol; NEN, Dreieich) wurden in 25 μl 0,5 N NaOH gelöst, die Benzyladenosin-Dialdehyd-Lösung zugegeben und die Mischung 30 min. bei Zimmertemperatur gehalten. Das Reaktionsprodukt wurde dünn-schichtchromatographisch gereinigt (Merck, Kieselgel 60-Alufolie, Laufmittel: Chloroform/Methanol, 9:2) und der entsprechende R_f -Bereich (0,26) mit Methanol eluiert. Das Eluat wurde eingengt, steril filtriert und bei -30°C aufbewahrt.

c) Oxidation von Isopentenyladenosin und Zeatinribosid

Die Oxidation der beiden Cytokinine wurde wie für Benzyladenosin durchgeführt.

d) Reduktion von Isopentenyladenosin- und Zeatinribosid-Dialdehyd

Zu 7,8 μMol (500 mCi) ^3H -NaBH₄ (40-60 Ci/mMol; NEN, Dreieich) wurden je 0,6 μMol Dialdehyd (in Ethanol) gegeben. Nach 10 min. wurde überschüssiges ^3H -NaBH₄ mit 30 μMol Retinal (in Ethanol) abgefangen. Nach weiteren 30 min. wurde der Reaktionsansatz mit Stickstoff zur Trockene eingedampft und zum Rückstand 50 μl Wasser und 500 μl Petrolether gegeben. Die Petroletherphase, das Retinol enthaltend, wurde abgetrennt und unter Stickstoff bei -18°C aufbewahrt. Die Wasserphase enthielt die Cytokinine, wurde mit Stickstoff zur Trockene gebracht, der Rückstand in Ethanol gelöst und dünn-schichtchromatographisch wie unter 2.8.3b gereinigt. Die Synthese der tritiummarkierten Cytokinindialkohole erfolgte unter entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen in einem gut funktionierenden Abzug hinter einer Schutzscheibe und unter Stickstoff.

2.8.4 Immunisierung

1ml BSA-Cytokinin-Konjugat (= 4 mg) wurde mit 1ml Freund's Adjuvant komplett (Behringwerke, Marburg) kurz beschallt. Von der Emulsion wurden je 0,5 ml pro Kaninchen subcutan injiziert. In den folgenden 2 Wochen wurde nochmals

wöchentlich je 0,5 ml Emulsion injiziert und nach einer Ruhepause von 3 Wochen erfolgte eine letzte Injektion von 0,5 ml. Am Ende der 7. Woche wurden ca. 15 ml Blut aus der Ohrvene entnommen. Nach 2 h Inkubation bei Raumtemperatur und über Nacht bei 4 °C wurde der Blutkuchen entfernt, das Serum für 1 h bei 10.000 x g zentrifugiert und der Überstand bei -25 °C aufbewahrt.

2.8.5 Test (20, 47)

Der RIA wurde immer in Duplikaten durchgeführt. Die Inkubationsmischung bestand aus 0,5 ml 0,01 M Phosphatpuffer pH 7,4 enthaltend 0,15 M NaCl; 0,1 ml Standard- oder Probelösung; 0,1 ml markierter Antigen-Lösung (0,15 µCi/ml); 0,1 ml BSA-Lösung (20 mg/ml, RIA-grade von Sigma) und 0,1 ml verdünntem Antiserum. Die Inkubationsdauer war 1 h bei Raumtemperatur. Danach wurden die Immunglobuline durch Zugabe von 1,2 ml 91%iger (NH₄)₂SO₄-Lösung präzipitiert und nach 30 min. durch Zentrifugation (5.200 x g, 30 min.) niedergeschlagen. Vom Überstand wurden 1,6 ml mit 3 ml Rotiszint 22 (Roth, Karlsruhe) versetzt, die Anzahl der radioaktiven Zerfälle im Flüssigkeitszintillationszähler (Kontron) gemessen und die Menge des gebundenen markierten Antigens berechnet: Radioaktivität (cpm) in der Probe ohne Antikörper minus Radioaktivität (cpm) in der Probe mit Antikörper.

2.9 Untersuchungen über ein cytokininbindendes Protein

2.9.1 Extraktion (48)

Stationäre Zellen der Aniskultur (50g) wurden mit 100 ml Homogenisierungspuffer* im Labormixer (Waring Commercial Division) für 1 min. bei maximaler Geschwindigkeit homogenisiert. Das Homogenat wurde zunächst 10 min. bei 2.000 x g zentrifugiert, der Überstand dann für 30 min. bei 23.000 x g. Dieser Überstand wurde anschließend 30 min. bei 80.000 x g zentrifugiert, der Niederschlag in Homogenisierungspuffer ohne PVP resuspendiert und 30 min. bei 80.000 x g zentrifugiert. Der Niederschlag wurde im Bindungstestpuffer gelöst (2,5 g Fg./ml) und in 1 ml Portionen bei -70 °C aufbewahrt.

* Homogenisierungspuffer (g/100 ml), pH 7,9:
Saccharose (8,56), Tris (0,605), Na₂-EDTA (0,037),
MgCl₂·6H₂O (0,02), K₂S₂O₅ (0,022), PVP (5,0).

Bindungstestpuffer (g/100 ml), pH 6,0:
Saccharose (8,56), MgCl₂·6H₂O (0,01), MgSO₄·7H₂O
(0,123), Natriumcitrat (0,294).

2.9.2 Bindungstest

1 ml des im Bindungstestpuffer gelösten Niederschlags wurde für 1 h bei 4°C mit $0,058 \mu\text{Ci } ^{14}\text{C}$ -Benzylaminopurin (54 mCi/mMol , Amersham Buchler, Braunschweig) inkubiert und anschließend auf eine Sephadex G-25 Säule ($8 \times 1,2 \text{ cm}$) aufgetragen. Die Säule wurde mit Bindungstestpuffer bei einer Durchflußrate von 60 ml/h eluiert. Von den gesammelten 1 ml Fraktionen wurden je $0,1 \text{ ml}$ für die Proteinbestimmung entnommen und die Radioaktivität der restlichen $0,9 \text{ ml}$ nach Zugabe von 3 ml Rotiszint 22 im Flüssigkeitszintillator bestimmt. Bei Kompetitionsuntersuchungen wurden die nichtmarkierten Cytokinine aus Stammlösungen von 10^{-2} M in DMF zugesetzt.

2.9.3 Affinitätschromatographie

A) Synthese von Sepharose-Isopentenyladenosin

a) Herstellung BrCN-aktivierter Sepharose (49)

Sepharose 4B wurde für 3 min. bei $100 \times g$ zentrifugiert. Der Niederschlag (50 ml) wurde mit 50 ml Wasser und 15 g feinverteiltem BrCN versetzt. Unter ständigem Rühren und Kühlen wurde der pH durch Zugabe von 8 N NaOH auf 11 und die Temperatur durch Zugabe von Eis unter 20°C gehalten. Das Ende der Reaktion wurde durch das Ende der Acidifizierung angezeigt. Die Sepharose wurde anschließend über einen mit Eis gefüllten Büchnertrichter filtriert und mit 800 ml eiskaltem $0,2 \text{ M NaHCO}_3$ -Puffer, pH 9,5, gewaschen.

b) Kopplung von Adipinsäure-Dihydrazid

Der Büchnertrichter mit BrCN-aktivierter Sepharose wurde mit Parafilm verschlossen und Adipinsäure-Dihydrazid (Sigma) ($4,5 \text{ mg}$ in 50 ml NaHCO_3 -Puffer) unter Rühren zugesetzt. Die Mischung wurde in ein Becherglas überführt, über Nacht bei 4°C gerührt, zuerst 5 x mit je $100 \text{ ml } 0,25 \text{ M NaHCO}_3$ -Puffer (pH 9,5 ; + $0,2 \text{ M NaCl}$) und dann 5 x mit je $100 \text{ ml } 0,1 \text{ M Natriumacetat-Puffer}$, pH 5,5 gewaschen.

c) Nachweis von Sepharose-Adipinsäure-Hydrazid (50)

Der Nachweis beruht auf der Bildung von rotgefärbten Trinitrophenyl-Derivaten von primären Hydraziden durch Reaktion mit Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS).

1) 1 ml Sepharose-Hydrazid wurde mit $0,5 \text{ ml Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ -Lösung ($4 \text{ g}/100 \text{ ml}$) gemischt und 4 Tropfen TNBS-Lösung ($3 \text{ \%}$ in Wasser) zugegeben.

2) 4 ml der Waschlösung wurden mit je 2 ml Borat-Lösung versetzt und 4 Tropfen TNBS-Lösung zugesetzt.

Das Sepharose-Hydrazid ergab sofort eine rostrote Färbung, während eine Kontrolle mit Sepharose 4B keine Reaktion zeigte. Die Waschlösung zeigte nur für die ersten 400 ml eine schwache Rotfärbung (nach 5 min.) an. Die restlichen 600 ml waren im Vergleich zu der Natriumacetat-Lösung negativ.

d) Oxidation von Isopentenyladenosin mit NaJO_4 (51)

169 mg Isopentenyladenosin wurden in 0,5 ml Pyridin gelöst und die Lösung mit Wasser auf 5 ml aufgefüllt. Nach Zugabe von 110 mg NaJO_4 wurde für 30 min. bei 0 °C inkubiert und anschließend bei Raumtemperatur für 30 min., bevor mit Essigsäure der pH auf 5,5 eingestellt und mit 0,1 M Natriumacetatpuffer desselben pH's auf 75 ml aufgefüllt wurde.

e) Kopplung von oxidiertem Isopentenyladenosin an Sepharose Adipinsäure-Hydrazid

Die obige Lösung von oxidiertem Isopentenyladenosin in 75 ml Puffer wurde mit 25 ml Sepharose-Adipinsäure-Hydrazid im selben Puffer versetzt und für 22 h bei 4 °C gehalten. Die Sepharose wurde dann sukzessive gewaschen, mit 500 ml 0,1 M Natriumacetatpuffer pH 5,5, dann mit 500 ml 0,1 M NaCl-Lösung und schließlich mit 1.500 ml Wasser. Verbleibende aktive Gruppen der Sepharose wurden durch Zugabe von 0,25 M Tris-Puffer pH 8,5 innerhalb von 2 h inaktiviert.

f) Natriumborhydrid-Reduktion von Sepharose-Isopentenyladenosin

25 ml Sepharose-Isopentenyladenosin in 0,25 M Tris-Puffer pH 8,5 wurden mit 15 mMol NaBH_4 versetzt und 15 h bei 4 °C unter Rühren inkubiert. Die Gelsuspension wurde anschließend mit 1M Essigsäure auf pH 5 eingestellt, nach weiteren 30 min. über eine Glasfritte filtriert und dann mit 1.500 ml Wasser gewaschen.

Gebundenes Isopentenyladenosin wurde mit 0,1 ml des gepackten Gelvolumens (1 x g), in 10 ml Wasser suspendiert, bestimmt. Der Extinktionswert bei 268 nm mit einer gleichen Menge an unbehandeltem Sepharose-Adipinsäure-Hydrazid als Referenz, ergab für die Berechnung des Kopplungsverhältnisses 1,4 μMol Isopentenyladenosin/ml gepacktes Gelvolumen.

B) Durchführung der Affinitätschromatographie

Die 80.000 x g Fraktion (ca. 11 mg, Extraktion unter 2.9.1) wurde ausgiebig gegen 10 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,6 (enthaltend 5 mM Magnesiumacetat) dialysiert. Die Isopentenyladenosin-Sepharose wurde bei 100 x g zentrifugiert und vom Niederschlag wurden 15 ml zu der dialysierten 80.000 x g Fraktion gegeben, mit Puffer auf 50 ml aufgefüllt und für 20 h bei 4 °C unter gelegentlichem Umrühren inkubiert. Nach Zentrifugation (100 x g, 5 min.) wurde der Niederschlag in eine Säule gefüllt, mit Puffer gewaschen (10 ml/h, 450 ml Waschvolumen) und mit 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 8 (enthaltend 1M KCl) eluiert (Elutionsvolumen 90 ml, 5 ml/Fraktion).

Proteinhaltige Fraktionen wurden vereint, zunächst gegen 10 mM Phosphatpuffer, dann gegen Wasser dialysiert. Das Dialysat wurde lyophilisiert und bei -70 °C aufbewahrt.

2.10 Allgemeine Methoden

2.10.1 Proteinbestimmung (nach Bradford, 56)

Reagenzlösung: 35 mg Serva Blau 250 G wurden in 25 ml Ethanol gelöst und nach Zugabe von 49 ml ortho-Phosphorsäure mit Wasser auf 500 ml aufgefüllt.

Durchführung: 0,1 ml Probe wurden mit 5 ml Reagenzlösung versetzt und kurz geschüttelt. Die Extinktionsmessung erfolgte gegen einen Blindwert (0,1 ml 0,15M NaCl und 5 ml Reagenzlösung) bei 595 nm zwischen 2 min. und 30 min. (Abb.3).

Zur Bestimmung geringer Proteinmengen (1 bis 10 μg) wurden 0,1 ml Probe mit 1 ml Reagenzlösung gemischt und wie oben weiter verfahren.

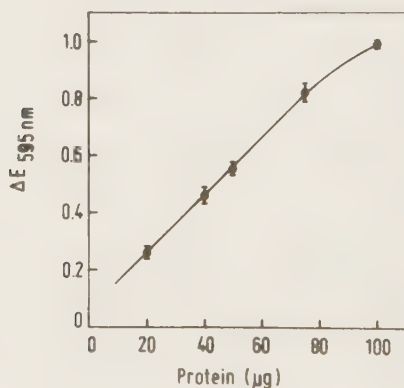


Abb.3. Eichkurve für die Proteinbestimmung nach Bradford (56). 1 ml der Proteinprobe wurde mit 5 ml Reagenzlösung versetzt; die Extinktion wurde bei 595 nm gegen einen Kontrollwert (ohne Protein) gemessen. $\bar{x}$ ist der Mittelwert von 3 Messungen.

2.10.2 SDS - Gel - Elektrophorese (nach Laemmli, 55)

Durchführung: 10-20 μ l der Probe, 5-20 μ g Protein enthaltend, wurden mit demselben Volumen an Probenpuffer versetzt, für 3 min. bei 100 °C im Wasserbad inkubiert und dann sofort in den Gelprobenraum eingebracht. Eine Trennung der Proteine wurde bei konstanter Spannung (120 V) und 8 °C erreicht. Die Färbung der Gele erfolgte innerhalb von 45 min., die Entfärbung über Nacht. Für die Proteintrennung wurden immer Gradientengele entsprechend den angegebenen Konzentrationen benutzt:

	Obergel (ml)	Untergel	
		9% (ml)	18% (ml)
1M Tris, pH 8,8	0,68	4,55	4,55
Wasser	4,40	5,38	3,66
60% Acrylamid	0,30	1,82	3,64
10% SDS	0,06	0,11	0,11
Ammonium- peroxodisulfat	0,20	0,10	0,10
5% TEMED	0,06	0,20	0,10

Elektrodenpuffer: 0,025 M Tris, 0,195 M Glycin, SDS (0,1%), pH 8,3-8,4.

Probenpuffer: 34 ml 10% SDS, 15 ml 1 M Tris-Puffer pH 6,8, 50 ml Glycerin, 1 ml Mercaptoethanol, Bromphenolblau (0,025 %), 100 ml Wasser.

Färbelösung: 2,2 g Coomassie Brilliant Blau, 80 ml Eisessig, 500 ml Methanol, 420 ml Wasser.

Entfärbelösung: 75 ml Eisessig, 100 ml Methanol, 825 ml Wasser.

2.10.3 Molare Extinktionskoeffizienten von Standardcytokininen

Die molaren Extinktionskoeffizienten von Standardcytokininen wurden bei 268 nm in Wasser bestimmt (Mittelwert aus 3 Messreihen). Benzyladenosin: 20.000 ; Isopentenyladenin: 15.000 ; Isopentenyladenosin: 21.428 ; Zeatinribosid: 20.513.

3. ERGEBNISSE

3.1 Das Embryogenese - System

Die in dieser Arbeit untersuchte cytokininautotrophe Zellkultur wurde 1980 aus Hypokotylexplantaten etiolierter Aniskeimlinge isoliert und hat mittlerweile 130 Passagen durchlaufen. Embryogenese kann immer noch durch Entzug von 2,4-D induziert werden, was für andere, in der Literatur beschriebene Systeme nicht immer zutrifft (57,58).

Die Kultur bestand aus Einzelzellen und Zellaggregaten, welche nach geeigneter Subkultivation, durch Überführung auf frisches Medium, innerhalb von 10 Tagen nach einem logarithmischen Wachstum die stationäre Phase erreichten (Abb. 4). Während des logarithmischen Wachstums erreichte der mitotische Index jeweils ein Maximum (Anstieg von ca. Null auf 2-3 %, 43).

In Gegenwart von 2,4-D ($4,4 \times 10^{-6}$ M) war die Embryogenese unterdrückt. Kulturen in einem derartigem Stadium werden als proembryonal bezeichnet. Durch Überführung auf ein 2,4-D freies Medium konnte die Embryogenese induziert werden (43,53). Abb.5 zeigt eine schematische Darstellung der Embryonalentwicklung in dieser Aniszellsuspensionskultur.

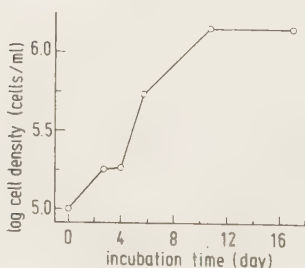


Abb.4. Wachstumskurve der Aniszellkultur (An 180). Kulturbedingungen: 1,8 l Fernbachkolben, 140 rpm, 1000 Lux, 27 °C.

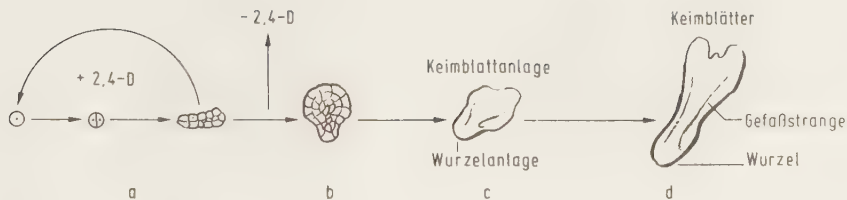


Abb.5. Schematische Darstellung der Embryonalentwicklung in Aniszellkulturen. a) proembryonales Stadium, b) globulärer Embryo, c) herzförmiger Embryo, d) torpedoförmiger Embryo

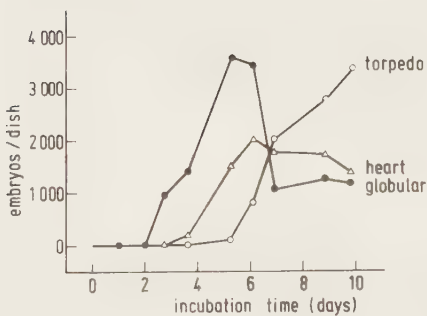
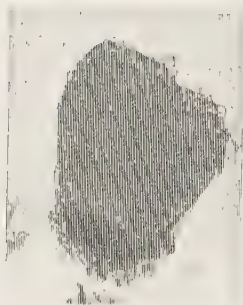


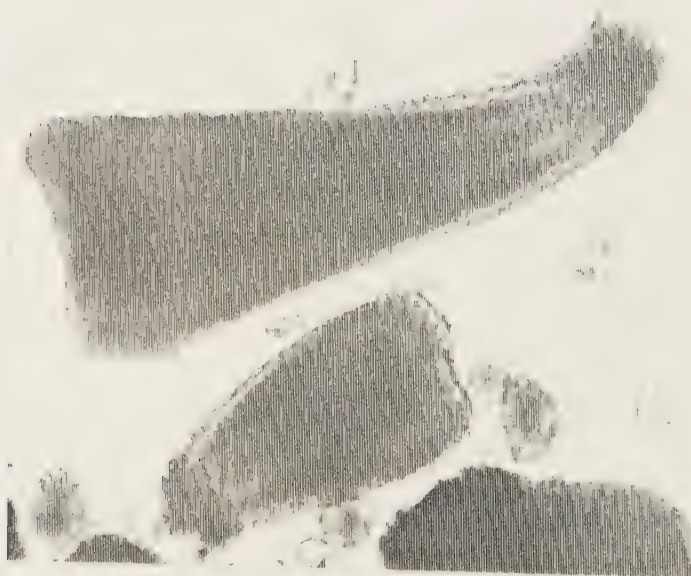
Abb.6. Embryonalentwicklung der Aniszellen nach Transfer auf 2,4-D freies Medium. Kulturbedingungen: Petrischale (94x16 mm), Volumen 20 ml, 60 rpm, 1000 Lux, 27 °C.



a



b



c

Abb. 7. Einzelne Embryonalstadien (x126); a) globulär, b) herzförmig, c) torpedoförmig.

Bei einer Anfangszelldichte von 10^5 Zellen/ml begann die Bildung globulärer Embryonen am 2. Tag nach Überführung der Zellen auf ein hormonfreies Medium und erreichte ein Maximum zwischen dem 5. und 6. Tag. Die Bildung herz- und torpedoförmiger Embryos begann zwischen dem 3. und 4. Tag, erreichte für die herzförmigen ein Maximum nach 6 Tagen, während die Anzahl torpedoförmiger weiter anstieg. Im weiteren Verlauf der Differenzierung traten dann schließlich Keimlinge mit voll ausgebildeten Kotyledonen und Wurzeln auf (Abb.6). In Abb.7 sind einzelne Embryonalstadien fotografisch dargestellt.

3.2 Methoden zur quantitativen Bestimmung von Cytokinen

Inwieweit spielen endogene Cytokine eine Rolle bei den Differenzierungsvorgängen während der Embryogenese? Um diese Frage klären zu können, wurden Zellkulturen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion der Embryogenese geerntet, extrahiert und auf ihren Cytokinengehalt hin analysiert.

Zur quantitativen Bestimmung der Cytokine gibt es primär 3 Haupttechniken: den Biotest (Übersichtsartikel wurden von Letham veröffentlicht, 25), den Radioimmunoassay (20) und die Gaschromatographie-Massenspektroskopie (66). Diese drei Methoden wurden in der vorliegenden Arbeit eingesetzt, wobei, soweit mir bekannt, ein erster direkter Vergleich dieser Techniken durchgeführt worden ist. Für die quantitative Bestimmung mittels SIM-Messungen wurde eine neue Extraktions- und Bestimmungsmethode entwickelt.

3.2.1 Der Bioassay

Der biologische Test ist die klassische Nachweismethode von Pflanzenwachstumsstoffen ganz allgemein. Für Cytokine gibt es zahlreiche Biotests, die von Letham (25) teilweise zusammenfassend beschrieben wurden. Der bekannteste und mit am empfindlichsten ist der Tabak-Kallus-Bioassay, welcher eine Nachweisgrenze von $< 5 \times 10^{-9}$ M Kinetin hat. Seine Durchführung ist mit 35 Tagen jedoch sehr zeitaufwendig. Allgemein läßt sich sagen, daß die Bioassays unterschiedlich lange dauern (2-35 Tage) und eine geringe Spezifität aufweisen. Die Nachweisgrenze liegt im Bereich von 10^{-6} bis 10^{-9} M (10^{-8} bis 5×10^{-12} Mol) Kinetinäquivalenten.

Für die Untersuchung wurde der *Amaranthus-Betacyan*-Bioassay ausgewählt, da er bei einer Zeitdauer von ca. 3 Tagen noch eine ausreichend erscheinende Empfindlichkeit von 10^{-8} M (2×10^{-11} Mol) Kinetin aufweist (45,60).

Abb.8 zeigt das typische Profil eines *Amaranthus-Betacyan*-Biotests. Im Bereich einer Isopentenyladenin-Konzentration von 5×10^{-8} bis 10^{-5} M (10^{-10} bis 2×10^{-8} Mol) ließen sich Cytokine quantitativ in vernünftigen Grenzen bestimmen. Konzentrationen über 10^{-5} M (2×10^{-8} Mol) hatten

einen hemmenden Einfluß auf die Betacyan-Synthese.

Hemmende Einflüsse sind auch durch andere Phytohormone zu erwarten. Nach Bigot (59) und Biddington (60) zeigten sowohl Abscisinsäure, Indoleessigsäure und Gibberelline eine derartige Wirkung. Auch 2,4-D, Bestandteil des Kulturmediums, wirkt ab 10^{-7} M (2×10^{-10} Mol) inhibitorisch auf den Test (43).

Derartige Störfaktoren sind, soweit sie nicht durch geeignete Reinigungsschritte teilweise entfernt wurden, immer in Betracht zu ziehen.

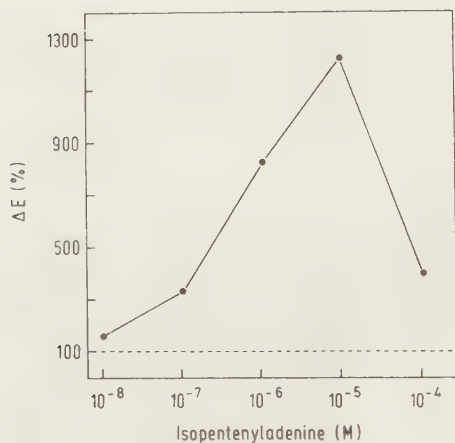


Abb. 8. Amaranthus-Betacyan-Bioassay. Die Extinktionsdifferenz $\Delta E_{542 \text{ nm}} - E_{620 \text{ nm}}$ des Kontrollwerts wurde auf 100 % festgesetzt.

3.2.1.1 Extraktion von Zellen für den Bioassay

Das folgende Schema zeigt die Extraktions- und Reinigungsschritte für Zellen und Embryonen:

Zellmaterial

↓ Homogenisation mit eiskaltem Methanol

Homogenat

↓ Filtration

Filtrat

↓ Methanol-Evaporation

wässrige Phase

↓ 1. PVP-batch Verfahren bei pH 3,5
2. Filtration

Filtrat

↓ Cellulosephosphat-Säulenchromatographie
(NH_4^+ , pH 3,1)

NH_4OH -Eluat

↓ Evaporation

wässrige Phase

↓ mit n-Butanol (wassergesättigt) ausschütteln

Butanol-Phase

↓ Evaporation
Rückstand in Ethanol/Wasser (35:65) lösen

Sephadex LH-20 Säulenchromatographie

↓

Fractionen im Bioassay testen

↓

aktive Fractionen im GC/MS analysieren

Um eine Aussage über die chemische Struktur von extrahierten Cytokinin machen zu können, wurde das Elutionsverhalten von Standardcytokininen auf einer Sephadex LH-20 Säule untersucht. Tabelle 1 zeigt die entsprechenden Elutionsvolumina.

Tabelle 1. Elutionsvolumina von Standardcytokininen auf einer Sephadex LH-20 Säule (64x1,6 cm). Elutionsmittel: Ethanol/Wasser (35:65). Flußrate 20 ml/h. Detektion bei 254 nm.

Cytokinin	Elutionsvolumen (ml)
Zeatinglucosid	100 - 125
Zeatinribosid	125 - 150
Zeatin	150 - 190
Isopentenyladenosin	190 - 230
Isopentenyladenin	260 - 300
Benzylaminopurinribosid	260 - 300
Benzylaminopurin	320 - 360

Aus der Literatur (75,76) war bekannt, daß bei der Reinigung von Cytokinin beträchtliche Verluste während der einzelnen Extraktionsschritte auftreten. Um derartige Verluste bei einer Quantifizierung korrigieren zu können, wurde mit Hilfe von radioaktiv markiertem Benzylaminopurin eine Ausbeutebestimmung durchgeführt. ^{14}C -Benzylaminopurin (Amersham, Braunschweig) wurde dazu zu Beginn einer Extraktion zugesetzt (Tabelle 2). Durchschnittlich ergab sich ein Verlust von ca. 30 %. Unberücksichtigt blieb hierbei jedoch, daß verschiedene Cytokinine auch unterschiedliche Verlustraten während der Extraktion aufweisen können. Innerhalb einer Cytokiningruppe trifft dies primär auf ribosylierte und glucosylierte Cytokinine zu (82).

Tabelle 2. Ausbeutebestimmung von ^{14}C -Benzylaminopurin während der Extraktion. Es wurden 0,2 μCi ^{14}C -Benzylaminopurin eingesetzt.

Extraktionsschritt	cpm-Werte (%)
eingesetzt	100
Methanol-Extraktion	100
PVP-batch Verfahren	93
Cellulosephosphat-Chromatographie	84
Butanol-Extraktion	78
Sephadex LH-20 Chromatographie	70

3.2.1.2 Extraktion verschiedener Embryonalstadien

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion der Embryogenese, ausgehend von 10^5 Zellen/ml wurden Zellen und Embryonen entsprechend der Vorschrift extrahiert und im Bioassay auf ihre Aktivität hin untersucht (Tabelle 3 und Abb.9).

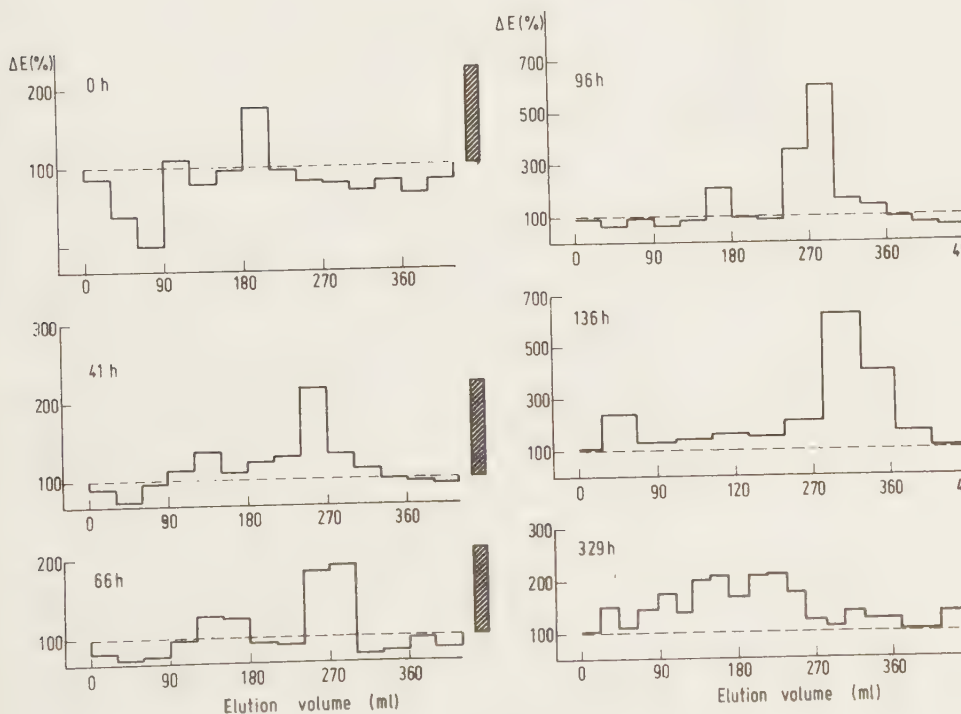


Abb.9. Amaranthus-Betacyan-Biotest von gereinigten embryonalen Aniszellextrakten nach einer Sephadex LH-20 Chromatographie. Die Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Kulturbeginn geerntet und in einer Endmenge von 25-30 g Fg. getestet. Der gestrichelte vertikale Balken entsprach einem Äquivalent von 5×10^{-8} M Isopentenyladenin.

Tabelle 3. Cytokininaktivität verschiedener Embryonalstadien
 i6Ade=Zeatin, i6Ado=Isopentenyladenosin, i6Ade=Isopentenyl-
 adenin.

Alter (h)	Embryotyp (%)	i6Ade (ng i6Ade-Äquiv./g Fg.)	i6Ado	i6Ade
2	Proembryo	-	0,6	-
41,5	Proembryo	0,3	-	1,1
66,5	Proembryo			
	globulär (100)	0,6	-	1,8
96	globulär (93)			
	herzf. (7)	0,4	-	6,4
136	globulär (53)			
	herzf. (33)			
	torpedof. (14)	0,1	-	4,8
329	torpedof. (100)			
	Keimlinge	0,4	-	0,7

In allen Versuchen konnten 2 Cytokininaktivitätsbereiche festgestellt werden. Der erste Bereich entsprach nach der Sephadex LH-20 Chromatographie dem Elutionsbereich von authentischem Zeatin. Die gefundenen Mengen waren jedoch zu gering, um gaschromatographisch weiter untersucht werden zu können. Die quantitativen Unterschiede während der Embryogenese waren minimal und lagen an der Nachweisgrenze. Der zweite Bereich entsprach dem Elutionsvolumen von authentischem Isopentenyladenin. Die in Reacti-Vials getrockneten Proben dieses Elutionsbereiches wurden trimethylsilyliert und dann in den Gaschromatographen injiziert. Auf Grund der Retentionszeit und den Massenpeaks (Abb.10a) konnte eindeutig Isopentenyladenin identifiziert werden.

Vom Molekülion m/e 347 entstand durch Verlust einer Methylgruppe das Ion m/e 332 und durch nachfolgende Abspaltung der Seitenkette das Ion m/e 264 (m/e 347 → m/e 332 → m/e 264). m/e 274 wird durch die Abspaltung einer Silylgruppe gebildet (m/e 347 → m/e 274) und m/e 192 durch Verlust der Seitenkette, einschließlich von N6 (m/e 347 → m/e 274 → m/e 204 → m/e 192). Das Ion m/e 304 entstand, in mesomerer Form, durch den Verlust von -CH-(CH₃)₂ in der Seitenkette (m/e 347 → m/e 304). Das Ion m/e 156 bewies die Anwesenheit der trimethylsilylierten Seitenkette (Abb.10b).

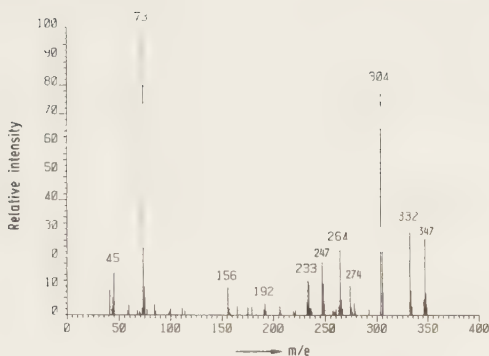


Abb.10a. Massenspektrum des TMS-Derivats eines gereinigten embryonalen Aniszelextrakts. Es wurde die im Bioassay aktive Fraktion des Isopentenyladenin-Elutionsbereichs getrocknet, trimethylsilyliert und dann in den GC injiziert. (Erläuterungen im Text).

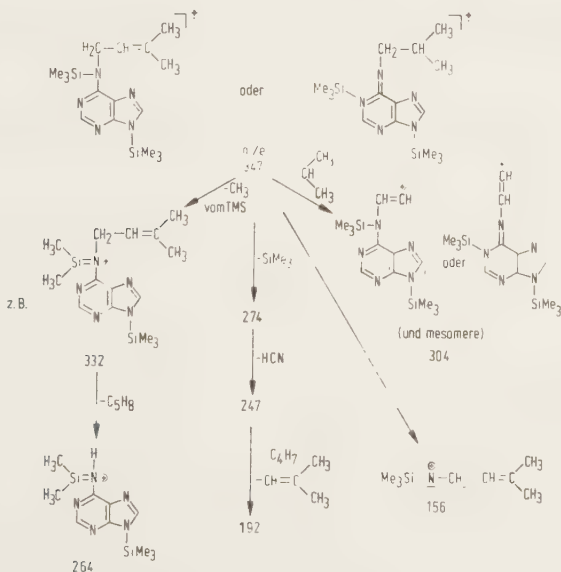


Abb.10b. Fragmentationsmuster von Isopentenyladenin, in Form des TMS-Derivats.

Quantitative Abschätzungen ergaben für Isopentenyladenin einen maximalen Gehalt von 6,4 ng/g Fg. Das Maximum fiel zeitlich mit der Bildung herzförmiger Embryonen zusammen. Die Menge der globulären Embryos erreichte hier ebenfalls ihr Maximum. Mit dem Fortschreiten der Embryogenese über die Bildung von torpedoförmigen Embryos bis hin zu Keimlingen sank die Konzentration an Isopentenyladenin wieder auf 0,7 ng/g Fg. ab.

Ein ähnliches Maximum an endogenen Cytokinen wurde in einer Sellerie-Gewebekultur gefunden (61). Diese Kultur war jedoch nicht cytokininautotroph und bedurfte der Zufuhr von exogenen Cytokinen während der Bildung globulärer Embryos.

Auf Grund dieses Maximums in der Aniszellkultur, zu Beginn der Bildung herzförmiger Embryonen, wäre eine Beteiligung von Isopentenyladenin an der Embryogenese durchaus denkbar. Weitere Untersuchungen mit Hilfe des RIA und der GC/MS legten jedoch eine andere Vorstellung über den Wirkungsmechanismus von Cytokinen während der Embryogenese nahe.

3.2.2 Der Radioimmunoassay

3.2.2.1 Antiseren-Charakteristika

Der Radioimmunoassay stellt die empfindlichste Nachweismethode für Cytokine dar (20,62,63). Die Nachweisgrenze liegt im fMol Bereich, desweiteren ist die Dauer eines Tests mit durchschnittlich 2-3 h extrem kurz.

Für einen RIA wurde immer nur das Antiserum aus jeweils einem Kaninchen benutzt. Die aus den Kaninchen gewonnenen Antiseren sind bezüglich ihrer Eigenschaften in Tabelle 4 charakterisiert. Abb.11-13 zeigen die Standardkurven der drei Seren.

Tabelle 4. Antiseren-Parameter und markierte Antigen-(Tracer-) Charakteristika. i6Ado=Isopentenyladenosin, io6Ado=Zeatinribosid, BAR=Benzyladenosin.

Parameter	i6Ado	io6Ado	BAR
Serum Titer (B=50%) (Endverdünnung)	1:6.300	1:1000	1:1470
Nachweisgrenze	100 pg	100 pg	100 pg
linearer Bereich der logit-Transformation (=Meßbereich)	0,25-10 ng	0,10-10 ng	0,30-20 ng
Tracer (spez.Akt.)	3,7Ci/mMol	1,4Ci/mMol	2,8Ci/mMol
eingesetzte Tracer Menge	7 nCi	7 nCi	7 nCi

* (logit-Transformation (64): $\text{logit } B/B_0 = \ln \frac{B/B_0}{1 - B/B_0}$)

B = gebundene Tracer-Menge in Anwesenheit eines Antigens;
 B₀ = gebundene Tracer-Menge in Abwesenheit eines Antigens).

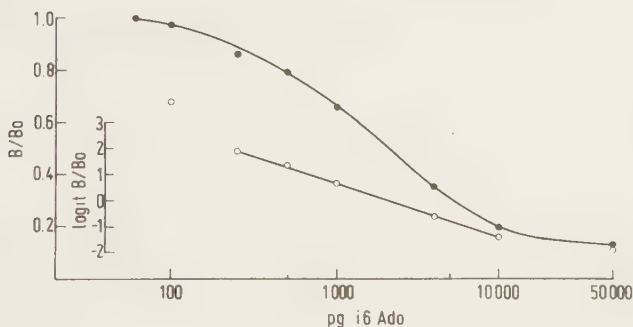


Abb.11. Standardkurve für den Isopentenyladenosin-Radioimmunoassay.*

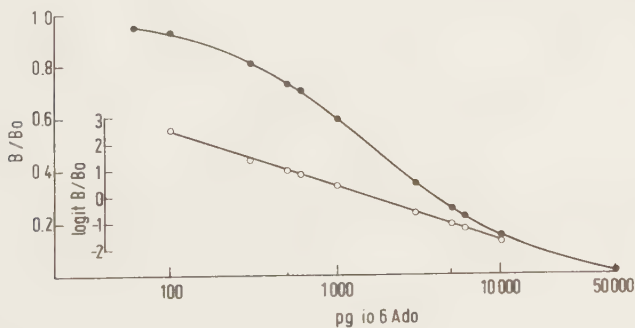


Abb.12. Standardkurve für den Zeatinribosid-Radioimmunoassay.*

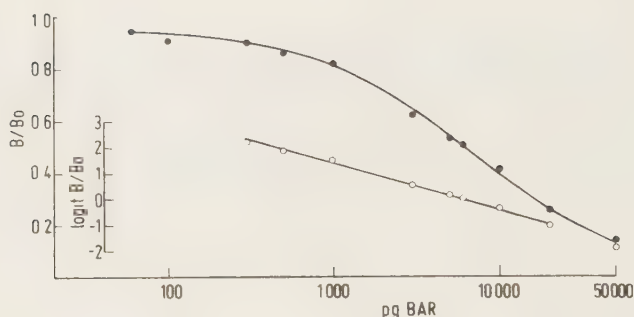


Abb. 13. Standardkurve für den Benzyladenosin-Radioimmunoassay.*

Der Serumtiter war mit 1:6300 für das Isopentenyladenosin-Antiserum am günstigsten. Für Zeatinribosid- und Benzyladenosin-Antiserum ergaben sich nicht so gute Werte. Dies ist auf eine unterschiedliche Produktion von Antikörpern in den jeweiligen Kaninchen zurückzuführen. Die Nachweisgrenze lag bei allen drei Antikörpern im Bereich von 100 pg. Als Meßbereich wurde jeweils ein etwas höherer Wert genommen: 200 pg bis 10 ng, da hier eine Linearität zwischen der eingesetzten Menge an unmarkierten Standardcytokininen und der logit-Transformation der Bindungsparameter bestand (64). In diesem Bereich war damit eine wesentlich bessere Ablesegenauigkeit mittels einer Eichgeraden gegeben. Die Selektivität der einzelnen Antiseren wurde mit Hilfe anderer Purinderivate getestet (Tabelle 5).

Tabelle 5. Antiserum-Spezifität. Kreuzreaktion mit anderen Cytokininen und Purinen auf molarer Basis.

pMol Standard für B/Bo = 0,5

% Kreuzreaktion = $\frac{\text{pMol Kompetitor für B/Bo} = 0,5}{\text{pMol Standard für B/Bo} = 0,5} \times 100$

i6Ado=Isopentenyladenosin, i6Ade=Isopentenyladenin,
io6Ado=Zeatinribosid, io6Ade=Zeatin, BAR=Benzyladenosin.

Purin	anti-i6Ado	anti-io6Ado	anti-BAR
i6Ado	100	< 1,5	22
i6Ade	67	< 1,0	6,7
io6Ado	< 1,0	100	< 1,0
io6Ade	< 1,5	41	< 1,0
BAR	118	< 1,0	100
Adenosin	0	0,07	0
Adenin	0	0,06	0

Für die Bestimmung einer Kreuzreaktion dienten Vergleiche der Standardkurven mit Kompetitorkurven auf molarer Basis, bei denen das Verhältnis B/Bo jeweils 0,5 war. Für das Isopentenyladenosin-Antiserum zeigte sich die erwartete Kreuzreaktion mit Isopentenyladenin (67%), sowie die schwachen Reaktionen mit Zeatinribosid (<1%) und Zeatin (<1,5%). Im Gegensatz dazu konnte mit Benzyladenosin, das bisher nur als synthetisches Cytokinin bekannt war, eine Kreuzreaktion, welche sogar die 100 % Grenze überschritt, festgestellt werden. Dies ist auf den apolaren Benzylring zurückzuführen, da Benzyladenosin bei Zeatinribosid-Antikörpern nur eine schwache Kreuzreaktion hervorrief (<1%). Charakteristisch war das Verhalten der Zeatinribosid-Antikörper, die eine schwache Reaktion mit Isopentenyladenosin (<1%) und Isopentenyladenin (<1%), dagegen die erwartete Reaktion mit Zeatin (41%) zeigten. Antikörper gegen Benzyladenosin zeigten ebenfalls eine gute Kreuzreaktion mit Isopentenyladenosin (22%) und Isopentenyladenin (6,7%), jedoch eine schwache mit Zeatinribosid (<1%) und Zeatin (<1%). Obgleich die Kreuzreaktion von Benzyladenosin-Antikörpern mit Isopentenylanaloga nicht so gut war wie im umgekehrten Fall, lassen sich folgende Aussagen über mögliche Bindungsstellen der Antikörper machen:

Die Bindung des Cytokinins an seinen Antikörper ist primär durch die N6-substituierte Seitenkette bedingt, da Adenin und Adenosin bei allen getesteten Antikörpern keine Reaktion hervorriefen. Bezüglich der Seitenkette ist eindeutig ihre Polarität und nicht ihre Struktur maßgebend, da zwischen Isopentenyladenosin und Zeatinribosid, bzw. zwischen Benzyladenosin und Zeatinribosid unterschieden wird, nicht jedoch zwischen Isopentenyladenosin und Benzyladenosin. Neben der Seitenkette ist auch der Riboserest an C-9 mit an der Bindung beteiligt, da die freien Basen eine schwächere Wirkung wie die entsprechend ribosylierten Basen aufwiesen. Ein ähnliches Verhalten wurde von Weiler für ein Isopentenyladenosin-Antiserum und Benzylaminopurin, sowie Benzylaminopurin-9-gucosid beschrieben (20). Für die weiteren Untersuchungen wurde neben Zeatinribosid-Antiserum nur Isopentenyladenosin-Antiserum verwendet, da es bezüglich der Isopentenyl-Gruppe bessere Bindungsparameter aufwies wie das Benzyladenosin-Antiserum.

3.2.2.2 Messungen von Cytokinen im Rohextrakt

Aniszellen aus der stationären Phase wurden homogenisiert und die wässrige Phase nach der Methanol-Evaporation zentrifugiert. Vom Überstand wurden Aliquote (0,1 ml), bzw. Verdünnungen des Überstands im RIA direkt getestet. Für die Isopentenyladenin-Gruppe ergaben sich bis zu 2,1 ng/g Fg., während die Zeatin-Gruppe bis zu 2,8ng/g Fg. aufwies. Ausbeutebestimmungen mit definierten Mengen an Isopentenyladenosin, bzw. Zeatinribosid, vor der Extraktion zugesetzt, ergaben 90%, so daß keine Korrektur der gefundenen Werte durchgeführt wurde.

3.2.2.3 RIA nach einer HPLC

Um Aussagen über die chemische Natur vorhandener Cytokine machen zu können, wurde von den Zellextrakten nach Methanolevaporation eine Sep-Pak-C18 Vorreinigung und anschließende HPLC durchgeführt. 4 ml Fraktionen wurden gesammelt, lyophilisiert, der Rückstand in Wasser (0,5 ml) gelöst und Aliquote davon im RIA getestet. Da die Retentionszeiten von Standardcytokinen bekannt war (Tabelle 6), ließen sich die im RIA aktiven Fraktionen einer Cytokininstruktur zuordnen.

Tabelle 6. HPLC von Standardcytokinen (Lichrosorb RP 8 5µm; 250x4,6 mm; Elutionsmittel: Wasser/Acetonitril, 70:30 0,5% Essigsäure enthaltend; Flußrate: 2ml/min.; Detektion bei 268 nm).

Purin	Zeit (min.)
Zeatin-9-glucosid	2,8
Zeatinribosid	2,8
Zeatin	5,2
Isopentenyladenosin	6,5
Isopentenyladenin	15,2

Abb.14 zeigt die Wachstumskurve einer embryonalen und proembryonalen Kultur, sowie die Veränderungen des jeweiligen Cytokininspiegels (siehe auch Tabelle 8). Die Bildung globulärer Embryos begann nach 48 h und erreichte das Maximum nach 95 h. Zu diesem Zeitpunkt setzte auch die Bildung herzförmiger Embryos ein. Ab dem 5.Tag traten torpedoförmige Embryonen auf. Nach 13 Tagen lagen 100% torpedoförmige Embryonen, sowie Keimlinge vor (Tabelle 7).

Tabelle 7. Bildung einzelner Embryonalstadien (Embryos/ml Medium). Die Anfangszellldichte betrug 4×10^4 Zellen/ml.

Zeitdauer (h)	globuläre E.	herzf. E.	torpedof. E.
24	-	-	-
48	3	-	-
68	36	-	-
95	23	1	-
115	23	5	2
142	15	3	5
168	20	5	9
214	19	6	19
312	es lagen nur noch torpedoförmige		
408	Embryos und Keimlinge vor		

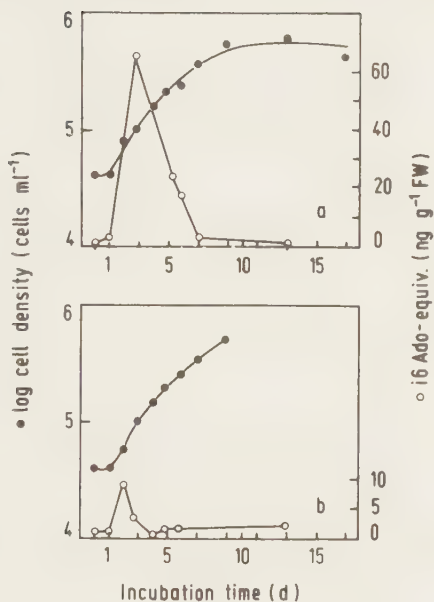


Abb.14. Wachstumskurve und Änderungen des Cytokininspiegels in einer proembryonalen (a) und embryonalen (b) Aniszellkultur. Die Zellextrakte wurden, wie für den RIA beschrieben, gereinigt und über eine HPLC-Säule chromatographiert. Die Werte entsprachen der Gesamtaktivität der Isopentenyladenin-Gruppe. (i6Ado=Isopentenyladenosin).

Abb.15 zeigt das durch den RIA gefundene Cytokininprofil eines proembryonalen Aniszellextraktes nach HPLC-Trennung. Folgende Cytokininzuordnungen konnten durchgeführt werden: Isopentenyladenosin (0,3 ng/g Fg.), Isopentenyladenin (0,4 ng/g Fg.), Zeatin (1,0 ng/g Fg.) und polare Cytokinine vom Zeatintyp einschließlich Zeatinribosid (1,2 ng/g Fg.).

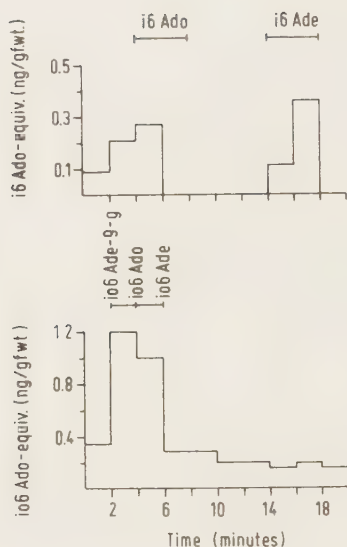


Abb.15. RIA eines gereinigten, stationären proembryonalen Aniszell-extrakts nach der HPLC. Mit Isopentenyladenosin-Antiserum (oben), mit Zeatinribosid-Antiserum (unten). Die Retentionszeiten von Standardcytokininen sind durch horizontale Balken dargestellt. (i6Ado=Isopentenyladenosin, i6Ade=Isopentenyladenin, io6Ade-9-g=Zeatin-9-glucosid, io6Ado=Zeatinribosid, io6Ade=Zeatin).

Tabelle 8a. Cytokininspiegel proembryonaler Aniszellkulturen unterschiedlichen Alters (ng/g Fg.) nach einer HPLC-Trennung. (- = nicht nachweisbar). i6Ado=Isopentenyladenosin, i6Ade=Isopentenyladenin, io6Ado=Zeatinribosid, io6Ade=Zeatin.

Zeit (h)	Isopentenyladenin-Gruppe			Zeatin-Gruppe	
	+ 2,4-D	polare Cyt.	i6Ado i6Ade	polare Cyt.+io6Ado	io6Ade
2	-	0,3	0,4	1,2	1,0
24	-	0,6	-	2,4	0,3
68	-	58,3	7,9	4,5	11,1
129	9,9	12,9	-	8,9	2,5
142	6,4	10,7	-	2,0	3,8
168	-	1,2	-	3,2	1,8
312	-	0,9	-	2,9	2,1

Tabelle 8b. Cytokininspiegel embryonaler Aniszellkulturen unterschiedlichen Alters (ng/g Fg.) nach einer HPLC Trennung. (- = nicht nachweisbar).

Zeit (h) - 2,4-D	Isopentenyladenin-Gruppe			Zeatin-Gruppe	
	polare Cyt.	i6Ado	i6Ade	polare Cyt.+i6Ado	i6Ade
2	-	0,3	0,4	1,2	1,0
24	-	-	-	4,7	1,9
48	2,0	4,0	1,4	3,6	3,6
68	1,3	1,4	0,9	5,7	2,5
95	-	-	-	1,8	1,0
115	-	1,7	-	-	-
129	-	0,9	1,1	0,7	2,1
312	-	1,2	0,9	-	-

Während des Wachstums der proembryonalen Zellen ergab sich ein drastischer Anstieg an Isopentenyladenosin von 0,3 ng/g Fg. auf 58,3 ng/g Fg. (Tabelle 8a). Anschließend sank der Gehalt an Isopentenyladenosin wieder ab, um nach ca. 14 Tagen wieder auf den Ausgangswert von annähernd 1 ng/g Fg. abgefallen zu sein. Ein ähnlicher Effekt zeigte sich für Isopentenyladenin, jedoch nicht so ausgeprägt. Das Maximum lag hier bei 7,9 ng/g Fg. nach 3 Tagen, ansonsten waren nur sehr niedrige Werte an der Nachweisgrenze des Tests zu finden, die jedoch nicht mehr im linearen Bereich der logit-Transformation lagen und deshalb auch nicht berücksichtigt wurden. Zusätzlich traten noch polare Cytokinine vom Isopentenyladenin-Typ auf, über deren Struktur nichts Definitives ausgesagt werden kann. Wahrscheinlich handelte es sich um Glucoside, denen jedoch generell eine Lagerfunktion und keine physiologische Funktion zugeschrieben werden kann (106). Interessant ist jedoch, daß diese polaren Cytokinine erst nach dem Maximum an Isopentenyladenosin und Isopentenyladenin auftraten und somit durch eine Glucosylierung von Isopentenyladenin entstanden sein könnten.

Für die Cytokinine vom Zeatin-Typ ergab sich für Zeatin selbst ein Anstieg von 1 ng auf 11,1 ng/g Fg. und ein Abfall auf ca. 2 ng/g Fg. im weiteren Verlauf des Zellwachstums (Tabelle 8a). Die polare Gruppe zeigte ebenfalls einen Anstieg und Abfall an Cytokininaktivität (1,2 ng → 8,9 ng → 2,9 ng/g Fg.). Inwieweit hierbei auch Zeatinribosid beteiligt war, ließ sich nicht eindeutig auf Grund des Elutionsverhaltens von Zeatinribosid und Zeatinglucosid sagen. Weitere Untersuchungen zeigten jedoch, daß es sich primär um Glucoside handeln muß (3.2.1.2, 3.2.3.2 und 43). Festzuhalten bleibt, daß das Maximum aller physiologisch aktiven Cytokinine zeitlich mit der log-Phase des Zellwachstums zusammenfiel (Tabelle 8a, Abb. 14a).

Für die embryonale Kultur (Tabelle 8b) ergaben sich unerwartete Mengen der jeweiligen Cyokinine. Für Isopentenyladenosin konnte ein schwaches Maximum nach 2 Tagen gefunden werden (4ng/gFg.); ebenso für Zeatin mit 3,6 ng/g Fg. Der Gehalt an Isopentenyladenin stieg auf 1,4 ng/g Fg. nach 2 Tagen, fiel dann vorübergehend auf nicht mehr nachweisbare Mengen ab, um in Keimlingen wieder auf 0,9 ng/g Fg. anzusteigen.

Polare Cytokinine vom Isopentenyladenintyp traten fast nicht auf, waren jedoch mit dem Vorhandensein von Isopentenyladenosin und Isopentenyladenin korreliert (2 und 1,3 ng nach 48h, bzw. 68h). Für den Zeatin-Typ war kein signifikantes Maximum erkennbar. Die Zeatinmenge schwankte zwischen Null und 3,6 ng/g Fg., die Hauptmenge wurde jedoch während der ersten 3 Tage gefunden. Für die mehr polare Gruppe galt ähnliches mit höheren Werten zu Beginn der Inkubation (3,6 - 5,7 ng/g Fg.) und einem anschließenden Abfall auf Null (Tabelle 8b).

Das Maximum der Aktivität aller Cytokinine lag auch hier im Bereich der log-Phase des Wachstums (Tabelle 8b, Abb.14b). Eine Korrelation zwischen endogenen Cytokinen und einer bestimmten Embryonalstufe ließ sich jedoch nicht nachweisen, da das Maximum der freien Cytokine bereits vor dem vermehrten Auftreten globulärer Embryos (Tabelle 7, Zeile 3) lag.

Weitere Untersuchungen, die mit einer anderen Nachweismethode (GC/MS) durchgeführt wurden, bestätigten dieses Ergebnis.

3.2.3 Gaschromatographie/Massenspektrometrie

Die Technik der Isotopenverdünnung zur mengenmäßigen Cytokininbestimmung in Zellextrakten wurde erstmals in den Jahren 1978-1979 durchgeführt (66,67). Sie beruht auf der Intensitätsmessung eines charakteristischen Einzelions der zu untersuchenden Substanz. Eine deuteriummarkierte identische Verbindung zeigt im Massenspektrum ein dem Deuterierungsgrad entsprechend höheres Molekularion, sowie auch entsprechend höhere Fragmentionen an. Bei Quantitätsmessungen wird eine bekannte Menge an deuteriertem internen Standard zugegeben und durch Intensitätsvergleich der nichtdeuterierten zu deuterierten Molekularionen (oder charakteristischer Fragmentionen) kann an Hand von Eichgeraden die exakte Menge der untersuchten, nicht deuterierten Substanz ermittelt werden. In Verbindung mit GC/MS ist es mit dieser Methode möglich, neben einer Strukturbestimmung auch ng-Mengen einer Substanz exakt zu bestimmen. Desweiteren müssen bei SIM-Messungen keine Ausbeutekorrekturen etwaiger Extraktionsverluste durchgeführt werden, da, wie schon erwähnt, nur das Einzelionen-Verhältnis der nichtdeuterierten Probe zu dem deuterierten Standard ausgewertet wird und mögliche Verluste sowohl die Probe, als auch den deuterierten Standard gleichermaßen betreffen.

Da die RIA-Untersuchungen bei den Cytokinen der Isopentenyladenin-Gruppe, speziell Isopentenyladenosin, die

markantesten Veränderungen während des Zellwachstums zeigten (Tabelle 8), beschränkten sich die SIM-Messungen auf die Analyse dieser Gruppe. Die Synthese der deuterierten Standardcytokinine erfolgte durch Reduktion von Dimethylacrylnitril mit LiAlD_4 zu d2-3-Methylbutenylamin und nachfolgende Reaktion des d2-Amins mit Chlorpurin, bzw. Chlorpurinribosid zu dem entsprechenden d2-Cytokinin (siehe unter 2.6.1 und 2.6.2).

Die in dieser Arbeit eingesetzten Materialien und Geräte erlaubten einen Nachweis von bis zu 1-2 ng Cytokinin. Die Nachweisgrenze war damit deutlich niedriger als im biologischen Test (20 ng), jedoch nicht so niedrig wie im RIA (0,1 bis 0,2 ng). Der entscheidende Vorteil der GC/MS Methode in Verbindung mit SIM-Messungen lag in der Strukturbestimmung, Spezifität, sowie in einer exakten Quantifizierung, da, wie schon erwähnt, keine Verlustkorrekturen durchgeführt werden mußten. Letzteres traf für den Bioassay nicht zu, da immer mit Interferenzen anderer Substanzen zu rechnen war, die das Ergebnis beeinträchtigen (60). Weiterhin zeigte der Bioassay eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber verschiedenen Cytokinen, d.h. er war unspezifisch und Resultate konnten nur in Cytokinin - Äquivalenten (Isopentenyladenin) angegeben werden. Ähnliches galt auch für den RIA, da auch hier bei einer Vorreinigung mit anschließender Chromatographie Verluste auftraten, die dann mit Hilfe radioaktiv markierter Standards, vor Beginn der Extraktion zugegeben, korrigiert werden mußten.

3.2.3.1 Eichkurven für Isopentenyladenin und Isopentenyladenosin

a) Isopentenyladenosin

Das Massenspektrum von Isopentenyladenosin ist im oberen Spektrum in Abb.16 dargestellt. Geeignete Massenverschiebungen prominenter Peaks von d2-Isopentenyladenosin ergeben sich aus dem Spektrum im unteren Teil in Abb.16 (553, 538, 234, 205). Strukturzuordnungen folgten aus Arbeiten von Hashizume (66,101) und Rice (102).

Für SIM-Messungen wurden die Molekularionen von Isopentenyladenosin (m/e 551) und d2-Isopentenyladenosin (m/e 553) benutzt. Abb.16 zeigt ebenfalls, daß Isopentenyladenosin bei m/e 553 selbst ein Signal aufweist, welches teilweise auf einen Isotopenbeitrag von ^{13}C und ^{29}Si zurückgeführt werden kann. Dadurch ergaben sich in Mischungen beider Substanzen Überlagerungseffekte und damit Meßwerte die korrigiert werden mußten.

15 SIM-Messungen, durchgeführt zu unterschiedlichen Zeitpunkten ergaben einen 16%igen Anteil der Peak-Fläche m/e 553 an der Peak-Fläche m/e 551 von Isopentenyladenosin. Das Verhältnis (R) m/e 551 : m/e 553 mußte somit entsprechend korrigiert werden:

$$R = \frac{\text{Peak-Fläche } m/e \ 551}{\text{Peak-Fläche } m/e \ 553 - 16/100 \times \text{Peak-Fläche } m/e \ 551}$$

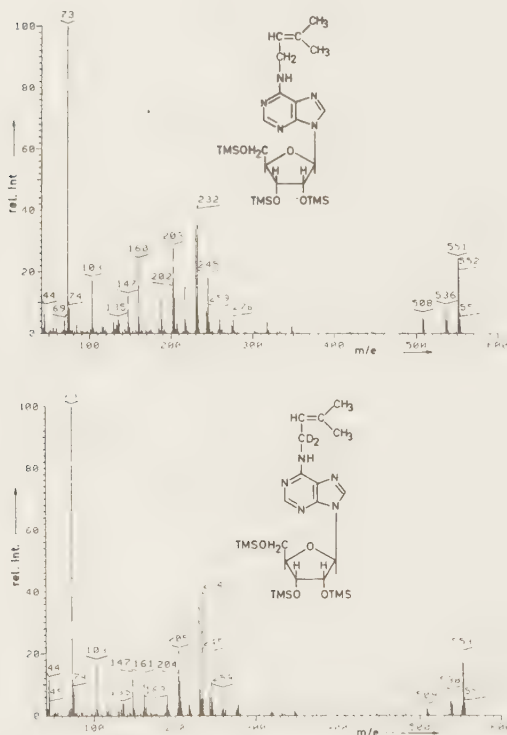


Abb.16. Massenspektrum der TMS-Derivate von Isopentenyladenosin (oben) und d2-Isopentenyladenosin (unten).

Wie aus Abb.16 ersichtlich, würden die Ionen m/e 232 und m/e 234 eine bessere Sensitivität ergeben, da die Intensität von m/e 234 bei Isopentenyladenosin gegenüber der Intensität von m/e 234 bei d2-Isopentenyladenosin vernachlässigt werden kann. Es zeigte sich, daß die Eichkurve für m/e 551 und m/e 553, nach Korrektur, identisch mit der Eichkurve von SIM-Messungen für m/e 232 und m/e 234 war (Abb.17). Sie war ebenso in guter Übereinstimmung mit jener von Hashizume (66) für Isopentenyladenosin und d6-Isopentenyladenosin (m/e 551 und m/e 557).

Bei Untersuchungen an Pflanzenmaterial ergab sich jedoch, daß es günstiger war, die SIM-Messungen mit hohen Massennionen, d.h. mit den Molekülionen durchzuführen, da kleine Massennionen von Nebenprodukten, welche durch die Gaschromatographie nicht abgetrennt werden konnten, eliminiert wurden. Der Hauptvorteil einer Auswertung ist somit eine erhöhte Selektivität auf Kosten einer geringfügigen Sensivität.

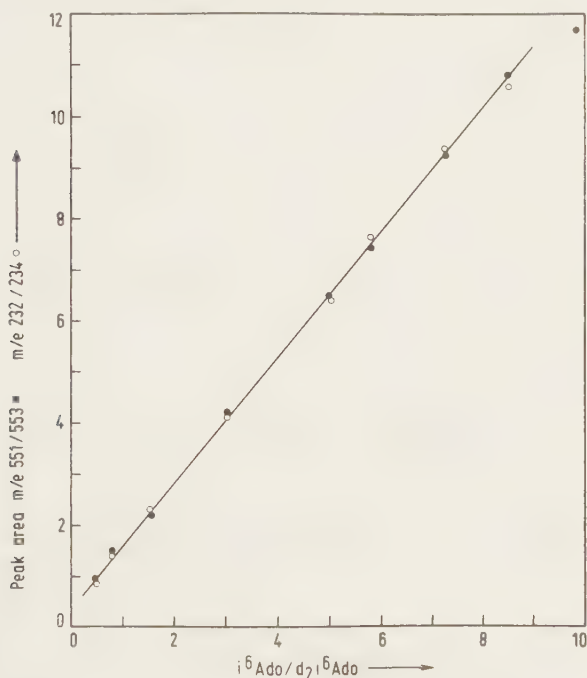


Abb.17. SIM-Eichkurve für Isopentenyladenosin, in Form der TMS-Derivate.

b) Isopentenyladenin

Eine Trimethylsilylierung, entsprechend den Isopentenyladenosin-Untersuchungen, war nicht möglich, da bei Mengen unter 50 ng keine quantitative Analyse mehr durchführbar war. Dies ist vermutlich auf eine Hydrolyse der N-SiMe₃ Bindung zurückzuführen. Es wurde daher eine Permethylierung durchgeführt.

In Abb.18 ist das Massenspektrum von Isopentenyladenin (18A) und d₂-Isopentenyladenin (18B) dargestellt. Strukturzuordnungen der einzelnen Fragmentionen für d₂-Isopentenyladenin

ergaben folgendes Muster: vom Molekülion (m/e 233) wurde durch Verlust eines Methylradikals das Ion m/e 218 gebildet. Verlust des Propylradikals in der Seitenkette führte zum Ion m/e 189. Abspaltung des Pentenylradikals ergab das Ion m/e 162. Das Ion m/e 134 entstand durch Abspaltung der gesamten N6-Seitenkette ($m/e 233 \rightarrow m/e 134$) und nachfolgende Abspaltung von HCN ergab das Ion m/e 107 ($m/e 233 \rightarrow m/e 134 \rightarrow m/e 107$). Das Ion m/e 100 entsprach der N6-Seitenkette. Unter Verwendung der Molekülionen m/e 231 und m/e 233 konnte bei SIM-Messungen eine lineare Eichkurve erstellt werden. (Abb.19).

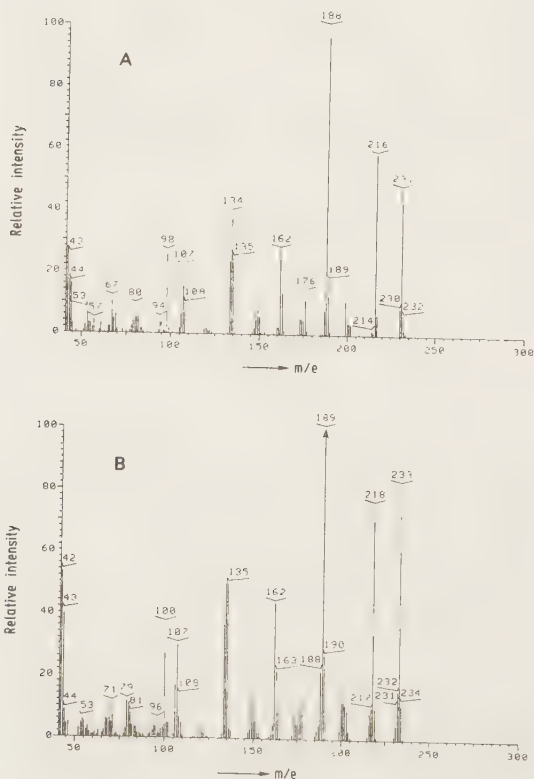


Abb.18. Massenspektrum von permethyliertem Isopentenyladenin (A) und d_2 -Isopentenyladenin (B).

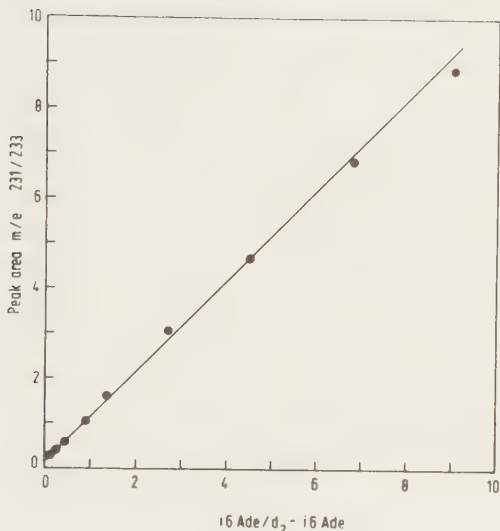


Abb.19. SIM-Eichkurve für Isopentenyladenin, in Form der Permethyl-Derivate.

3.2.3.2 Bestimmung von Isopentenyladenin und Isopentenyladenosin in einer embryonalen und proembryonalen Kultur

In Abb.20 ist die Wachstumskurve, sowie das Auftreten einzelner Embryonalstadien für diese Versuchsreihe dargestellt. Wie in den vorangegangenen Untersuchungen ergab sich wiederum der typische Wachstumsverlauf über eine log-Phase mit einer anschließenden stationären Phase. Auch das Auftreten der jeweiligen Embryonalstufen entsprach der bereits geschilderten Entwicklung von Anisembryonen.

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transfer auf 2,4-D freies, bzw. 2,4-D haltiges Medium, wurden die Zellen entsprechend der konventionellen Methode über Cellulosephosphat-Ionenaustauschchromatographie, Lösungsmittelverteilung und Sephadex LH-20 Chromatographie gereinigt (siehe unter 2.3.1).

Zu Beginn jeder Homogenisation wurde eine definierte Menge an d₂-Isopentenyladenosin und d₂-Isopentenyladenin den Zellen zugesetzt. Nach der Cellulosephosphat-Säulenchromatographie wurden die Fraktionen A (Wasch-Fraktion) und B (Elutions-Fraktion) weiter analysiert. Nach Literaturangaben (68) befinden sich in der Fraktion A eventuell vorhandene Cytokininphosphate und in der Fraktion B die nicht phosphatgebundenen Cytokinine (freie Cytokinine).

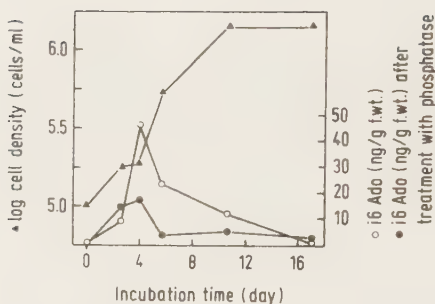


Abb. 20a. Wachstumskurve und Cytokininspiegel einer proembryonalen Aniszellkultur. Der freie Cytokininingehalt für Isopentenyladenosin (i6Ado) wurde mit SIM-Messungen bestimmt. Phosphatgebundenes Isopentenyladenosin wurde nach einer Phosphatase-Inkubation und Reinigung durch Papierchromatographie mit dem RIA bestimmt.

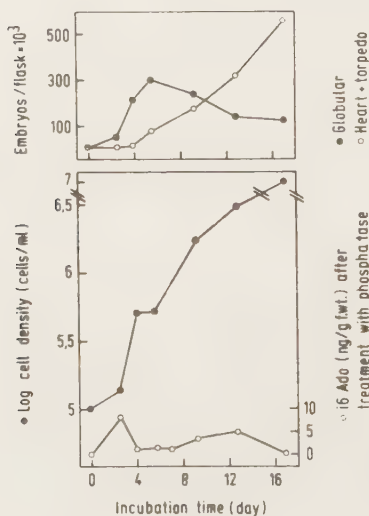


Abb. 20b. Wachstumskurve, Embryonalentwicklung und Cytokininspiegel in einer embryonalen Aniszellkultur. Die Cytokininbestimmung erfolgte entsprechend der Legende in Abb. 20a. (i6Ado=Isopentenyladenosin).

Um sicherzustellen, daß die freien Cytokinine durch den Waschvorgang nicht von der Cellulosephosphat-Säule eluierten, wurde in Vorversuchen den Zellextrakten nach Methanolevaporation und PVP-Vorreinigung ^{14}C -Benzylaminopurin zugesetzt und anschließend eine Ionenaustauschchromatographie durchgeführt. Wie aus Tabelle 9 ersichtlich konnten erst in der Elutionsfraktion 2 92% der eingesetzten Radioaktivität gefunden werden, die restlichen 8% waren nicht eluierbar. Weiterhin wurden Tabakblätter rGV1 entsprechend der Vorschrift A (siehe 2.3.1) extrahiert. Als interne Standards wurden $10\text{ }\mu\text{g}$ d2-Isopentenyladenin und $5\text{ }\mu\text{g}$ d2-Isopentenyladenosin zugesetzt. Nach Papierchromatographie (Whatman 3MM) wurden die Rf-Abschnitte im Biotest auf Cytokininaktivität untersucht. Es konnte keine Aktivität, auch nicht im Rf-Bereich von Isopentenyladenosin und Isopentenyladenin nachgewiesen werden. Wurden die Zellextrakte vor der Papierchromatographie jedoch mit alkalischer Phosphatase inkubiert, welche die Cytokininphosphate in Cytokininriboside und Phosphat spaltet, konnte nach der Papierchromatographie eine Aktivität im Rf-Bereich von Zeatinribosid gefunden werden. Die zugesetzten deuterierten Cytokinine waren also, im Gegensatz zu dem Cytokininphosphat, nicht von der Cellulosephosphat-Säule mit verdünnter Essigsäure pH 3,1 eluiert worden.

* Tabakpflanze, regeneriert aus einem octopin Wurzelhalsgalen-Tumor, welcher durch eine Mutante von *Agrobacterium tumefaciens* erzeugt wurde.

Tabelle 9. Cellulosephosphat-Säulenchromatographie (1,8 ml Säulenvolumen). 1g Zellmaterial wurde entsprechend homogenisiert und extrahiert. Vor der Cellulosephosphat-Chromatographie wurde ^{14}C -Benzylaminopurin (36.000 cpm) zugesetzt. Es wurden 1,5ml Fraktionen gesammelt, deren Radioaktivität nach Zusatz von Rotiszint 22 gemessen wurde.

Waschfraktionen	cpm	Elutionsfraktionen	cpm
1	84	1	12
2	23	2	33.000
3	15	3	32
4	8	4	35
5	11	5	39

a) weitere Analyse der Elutionsfraktion B nach Cellulosephosphat-Säulenchromatographie:

Das ammoniakalische Elutionsvolumen der Ionenaustauschchromatographie wurde am Rotationsverdampfer eingeengt und

der wässrige Rückstand mit wassergesättigtem n-Butanol ausgeschüttelt. Die Butanol-Phase wurde zur Trockene gebracht, der Rückstand in Ethanol/Wasser (35:65) gelöst und auf einer Sephadex LH-20 Säule (26x2 cm) chromatographiert. Da in dieser Versuchsreihe primär nur die Elutionsvolumen von Isopentenyladenosin und Isopentenyladenin interessant waren, wurde im Gegensatz zu den reinen Biotest-Untersuchungen (siehe Tabelle 1) eine kleinere Sephadex-Säule eingesetzt, die eine einwandfreie Trennung der beiden Cytokinine bei verkürzter Chromatographiedauer ermöglichte (Tabelle 10).

Tabelle 10. Sephadex LH-20 Chromatographie (26x2 cm) von Standardcytokininen. Elutionsmittel: Ethanol/Wasser (35:65). Flußrate: 20 ml/h. Detektion bei 254 nm.

Cytokinin	Elutionsvolumen (ml)	Fraktions-Nr.
Zeatinglucosid	68 - 87	2 - 3
Zeatinribosid	87 - 114	3 - 4
Zeatin	114 - 127	4
Isopentenyladenosin	129 - 153	5
Isopentenyladenin	161 - 198	6 - 7
Benzylaminopurinribosid	161 - 198	6 - 7

Von den gesammelten 31 ml Fraktionen wurden die Fraktionen 1-4 und Fraktion 8 im Bioassay getestet (Tabelle 13), Fraktion 5 (Isopentenyladenosin) und Fraktionen 6+7 (Isopentenyladenin) wurden durch GC/MS analysiert (Tabellen 11,12).

Tabelle 11. Quantifizierung von Isopentenyladenosin und Isopentenyladenin mittels GC/MS während der Embryogenese (- 2,4-D); (n.b. = bestimmbar, - = nicht nachweisbar); i6Ado=Isopentenyladenosin, i6Ade=Isopentenyladenin.

Zeit(h)	Fg.(g)	d2-i6Ado (ng)	m/e 551/553	d2-i6Ade (ng)	m/e 231/233	i6Ado (ng/g Fg)	i6Ade (ng/g Fg)
2	212,83	520	-	390	-	-	-
64	45,60	520	0,11	390	0,12	n.b.	<
96	60,42	520	0,14	1560	0,05	n.b.	<
134,5	64,47	520	-	780	0,06	-	<
167	55,30	520	-	624	0,06	-	<
222	61,55	520	-	468	0,05	-	<
306	59,33	520	-	390	0,06	-	<
408	183,08	520	-	390	-	-	-

Tabelle 12. Quantifizierung von Isopentenyladenosin und Isopentenyladenin durch GC/MS in einer proembryonalen Kontrollkultur (+ 2,4-D) (n.b. = nicht bestimmbar, - = nicht nachweisbar)
i6Ado=Isopentenyladenosin, i6Ade=Isopentenyladenin.

Zeit(h)	Fg.(g)	d2-i6Ado (ng)	m/e 551/553	d2-i6Ade (ng)	m/e 231/233	i6Ado (ng/g Fg.)	i6Ade (ng/g Fg.)
2	103,72	208	-	156	0,16	-	<0,3
64	17,38	208	1,40	156	0,41	9,6	2,2
96	15,09	208	4,64	156	0,06	46,9	<2,2
134,5	17,57	208	2,80	156	0,11	23,7	<1,8
256	22,63	208	1,97	156	0,11	12,3	<1,4
408	32,72	208	0,14	156	-	n.b.	-

Im Biotest wurde in allen getesteten Fraktionen nur jeweils in der Fraktion 4 (Zeatinribosid/Zeatin) eine Aktivität von 0 - 2 ng Isopentenyladenin-Äquiv./g Fg. festgestellt. Die anderen Fraktionen waren negativ (Tabelle 13).

Tabelle 13. Cytokininaktivität im Elutionsbereich von Zeatinribosid/Zeatin nach einer Sephadex LH-20 Chromatographie. Die Werte wurden mit dem Bioassay bestimmt und sind in ng Isopentenyladenin-Äquiv./g Fg. angegeben (n.d. = nicht durchgeführt, - = nicht nachweisbar).

Zeit(h) proembryonal embryonal

2	0,27	0,27
64	0,44	-
96	2,01	0,27
134,5	0,89	0,25
167	n.d.	0,23
222	n.d.	0,41
256,5	0,35	n.d.
306	n.d.	1,20
408	0,27	0,15

Während des Zellwachstums ergab sich auch in dieser Versuchsreihe ein Maximum an Isopentenyladenosin für die proembryonale Kultur während der log-phase (46,9 ng/g Fg.; Tabelle 12, Zeile 3, Abb.20a) und ein Abfall der Cytokininaktivität im weiteren Wachstum der Zellen bis auf Null. Für Isopentenyladenin war das Maximum nicht so ausgeprägt wie bei den RIA-Versuchen (siehe 3.2.2.3, Tabelle 8a), doch mit 2,2 ng/g Fg. noch deutlich verschieden von den Anfangs- und Endwerten dieser Reihe (<0,3 ng/g Fg., bzw. 0).

In der embryonalen Kultur konnte kein Isopentenyladenosin nachgewiesen werden, da das Ionenverhältniss m/e 551 / m/e 553 am Rande der Nachweisgrenze lag. Nach einer Inkubationsdauer von 96 h, d.h. während der log-Phase, war das Ionenverhältnis jedoch am größten (Tabelle 11, Zeile 2,3) und damit war auch hier die höchste Isopentenyladenosin-Konzentration vorhanden, was den bisherigen Ergebnissen entsprach.

Für Isopentenyladenin ergaben sich ebenfalls keine drastischen Schwankungen mit Werten um 2ng/g Fg. (Tabelle 11). Dies entsprach den im RIA gefundenen Mengen.

Für Zeatinribosid/Zeatin waren die hier im biologischen Test ermittelten Werte wesentlich kleiner als in den reinen RIA-Versuchen (siehe 3.2.2.3), mit einem Maximum (2 ng/g Fg.) während der log-Phase für die proembryonale Kultur und nahezu gleichbleibenden Mengen (kleiner 1,2 ng/g Fg.) in der embryonalen Kultur (Tabelle 13).

Eine Korrelation zwischen Embryonalentwicklung und endogenen Cytokinin war jedoch auch nicht nachweisbar (Abb.20b).

b) weitere Analyse der Fraktion A:

In der Waschfraktion der Cellulosephosphat-Chromatographie könnten sich noch extrem polare Cytokininphosphate befinden (68). Nach Evaporation des Wassers wurde der Rückstand deshalb noch weiter analysiert. Eine Phosphataseinkubation würde eventuell vorhandene Cytokininphosphate ebenfalls einer Analyse zugänglich machen.

Nach Phosphatase-Inkubation des Rückstands, durchgeführt in Tris-Puffer pH 9,5, wurde die wässrige Phase mit wassergesättigtem n-Butanol ausgeschüttelt (pH 8). Die Butanol-Phase wurde evaporiert, der Rückstand in Methanol gelöst und auf Whatmann 3MM Papier chromatographiert. Die Chromatogramme wurden in 10 Abschnitte unterteilt und direkt im Bioassay getestet (Tabelle 14).

Tabelle 14. Bioassay der Fraktionen A nach Papierchromatographie. ΔE ist in % angegeben, wobei der Kontrollwert 100 % entspricht. i6Ade=Isopentenyladenin.

Zeit (h)	g Fg./ Assay	.1	.2	.3	.4	Rf-Werte						i
						.5	.6	.7	.8	.9	1. 5x1	

(embryonal)												
2	20,0	124	57	62	129	135	122	73	216	273	149	2
64	14,4	168	77	88	120	152	200	156	208	308	200	3
96	14,5	184	104	88	132	136	176	136	212	308	148	3
134,5	15,5	92	84	68	64	168	188	148	248	248	124	3
167	17,5	102	35	35	83	76	106	93	111	200	115	1
222	19,4	102	46	35	78	78	96	91	235	193	98	1
306	18,7	83	41	33	83	133	146	128	235	159	85	1
408	23,0	130	46	19	5	105	159	81	168	138	95	2

Fortsetzung Tabelle 14:

(proembryonal)

2	17,3	108	40	35	68	111	95	88	183	278	158	228
64	5,8	113	110	43	60	138	123	90	235	218	138	228
96	5,0	128	63	43	40	115	165	75	128	150	85	228
134,5	5,9	160	53	66	68	111	198	87	148	247	139	337
256,5	7,5	160	34	53	39	113	163	79	197	261	145	337
408	10,9	116	29	34	34	97	105	79	192	221	118	337

Bei allen Proben konnte im Rf-Bereich von .8 bis 1. eine hohe Cytokininaktivität gefunden werden. Dieser Bereich entsprach dem Laufverhalten von authentischem Isopentenyladenosin und Zeatinribosid. Die Aktivitäten bei Rf .5 bis .6 konnten keinen Standardcytokininen zugeordnet werden und wurden nicht weiter untersucht. Auf Grund ihres Rf-Werte müssen sie jedoch polarer als Zeatinribosid oder Isopentenyladenosin sein.

Die Rf-Abschnitte von .7 bis 1. wurden mit Methanol/Wasser (80:20) eluiert, das Lösungsmittel wurde evaporiert und der Rückstand in Wasser gelöst. Aliquote davon wurden mit Hilfe des RIA quantitativ erfasst (Tabelle 15).

Tabelle 15. RIA der Fraktion A nach Papierchromatographie. Es wurden der Rf-Bereich 0,7 - 1,0 getestet. Die Werte sind in ng/g Fg. angegeben (n.d.=nicht durchgeführt, =nicht nachweisbar) io6Ado=Zeatinribosid, i6Ado=Isopentenyladenosin.

Zeit (h)	proembryonal		embryonal	
	io6Ado	i6Ado	io6Ado	i6Ado
2	0,09	0,16	0,25	0,34
64	-	14,07	0,7	8,01
96	0,29	17,4	0,41	1,13
134,5	0,22	3,5	0,34	1,23
167	n.d.	n.d.	0,27	1,05
222	n.d.	n.d.	0,34	3,76
256,5	0,34	5,3	n.d.	n.d.
306	n.d.	n.d.	0,57	5,41
408	0,06	2,41	0,11	0,46

Die in Tabelle 15 dargestellten Werte illustrieren, daß durch die Phosphatase-Inkubation gebundene Cytokinine freigesetzt wurden. Diese Cytokininphosphate können als Degradationsprodukte der RNA aufgefasst werden. Bezüglich Zeatinribosid blieben die Werte während des Zellwachstums annähernd konstant (0,06-0,7 ng/g Fg.). Dies galt für proembryonale/embryonale Kulturen gleichermassen.

Für Isopentenyladenosin ergaben sich jedoch beträchtliche Schwankungen. - 2,4-D Zellen (Embryos) zeigten nach 2,5 Tagen ein Maximum von 8 ng/g Fg., welches dann wieder auf 1 ng/g Fg. abfiel. Nach 9 - 10 Tagen wurde ein kleineres 2. Maximum von 5,4 ng/g Fg. festgestellt (Tabelle 15, Abb.20b). + 2,4-D Zellen (Proembryos) zeigten ebenfalls ein Maximum nach 2,5 - 4 Tagen, das jedoch höhere Werte im Vergleich zur embryonalen Kultur aufwies (17,4 ng/g Fg.). Das Cytokinin-niveau fiel dann auf 3,5 ng/g Fg. ab, um nach 10 Tagen ebenfalls wieder leicht anzusteigen (5,3 ng/g Fg.). Stationäre Kulturen zeigten dann Werte von < 3 ng/g Fg (Tabelle 15, Abb.20a).

Korrekturen in Bezug auf etwaige Verluste wurden nicht durchgeführt, so daß die absoluten Werte der Cytokinine etwas höher anfallen dürften. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß das Maximum der Cytokinin-Phosphate dem Maximum der freien Cytokinine sowohl in der proembryonalen, als auch in der embryonalen Kultur zeitlich vorangeht.

3.2.3.3 Cytokininanalyse des Mediums

Da mögliche Rückkopplungsmechanismen, ausgelöst von Cytokinen, die von den Zellen an das Medium abgegeben werden, für das Verständnis der Cytokininwirkung wichtig sein könnten, wurde das lyophilisierte Medium ebenfalls durch SIM-Messungen analysiert.

Nach der Cellulosephosphat-Chromatographie wurde die Elutionsfraktion mit wassergesättigtem n-Butanol ausgeschüttelt und die vereinigten Butanolphasen am Rotationsverdampfer abgezogen. Der Rückstand wurde in Ethanol/Wasser (35:65) gelöst und auf einer Sephadex LH-20 Säule (26x2 cm) chromatographiert. Fraktionen, im Elutionsbereich von authentischem Isopentenyladenosin und Isopentenyladenin wurden getrocknet und nach Trimethylsililierung, bzw. Permethylierung im GC/MS System untersucht (Tabelle 16 und 17).

Tabelle 16. Cytokiningehalt des + 2,4-D Kulturmediums (pg/ml Medium). An deuterierten Standards wurden jeweils dieselben Mengen eingesetzt; d2-i6Ado: 260 ng, d2-i6Ade: 195 ng. (n.b. = nicht bestimmbar, - = nicht nachweisbar). i6Ade=Isopentenyladenin, i6Ado=Isopentenyladenosin.

Zeit (h)	Volumen (ml)	m/e 231/233	m/e 551/553	i6Ade (pg/ml)	i6Ado (pg/ml)
2	1635	-	0,37	-	n.b.
64	5700	-	0,91	-	23
96	3700	-	0,56	-	10
134,5	2340	-	0,65	-	28
256,5	870	-	0,29	-	n.b.
408	415	-	0,23	-	n.b.

Tabelle 17. SIM-Messungen des - 2,4-D Mediums. Eingesetzte Menge an deuterierten Standards, d2-i6Ado: 260 ng. (n.b. = nicht bestimmbar, - = nicht nachweisbar).
i6Ade=Isopentenyladenin, i6Ado=Isopentenyladenosin.

Zeit (h)	Volumen (ml)	d2-i6Ade (ng)	m/e 231/233	m/e 551/553	i6Ade (pg/ml)	i6Ado (pg/ml)
2	3210	195	-	-	-	-
64	5705	273	-	-	-	-
96	3790	780	-	0,15	-	n.b.
134,5	2265	624	-	-	-	-
167	1350	390	-	0,1	-	n.b.
222	875	312	-	0,1	-	n.b.
306	390	156	-	0,1	-	n.b.
408	260	156	-	0,1	-	n.b.

Die restlichen Fraktionen der Sephadex LH-20 Chromatographie wurden entsprechend den zellulären Fraktionen im Biotest untersucht. Es konnte ebenfalls nur im Elutionsbereich von Zeatinribosid/Zeatin eine schwache Aktivität nachgewiesen werden (Tabelle 18).

Tabelle 18. Zeatinribosid/Zeatin-Gehalt des Mediums (pg/ml). Die Bestimmung erfolgte mit dem Biotest, nach einer Sephadex LH-20 Chromatographie. (n.d. = nicht durchgeführt).

Zeit (h) - 2,4-D + 2,4-D

2	4	5
64	2	1
96	3	3
134,5	2	4
167	10	n.d.
222	20	n.d.
256,5	n.d.	6
306	14	n.d.
408	40	27

Im Medium beider Kulturen (+/- 2,4-D) konnten praktisch keine Cytokinine nachgewiesen werden. Die gefundenen Mengen in der proembryonalen Kultur für Isopentenyladenosin, während der log-Phase sind so gering (10 bis 30 pg/ml), daß eine physiologische Bedeutung unwahrscheinlich ist. Das gleiche gilt für den allmählichen Anstieg von Zeatinribosid/Zeatin in beiden Kulturmedien (4 bis 40 pg/ml).

3.3 Exogene Applikation von Cytokinin zu der Aniszellkultur

Die bisherigen Ergebnisse zeigten keine Korrelation von endogenen Cytokinin und Embryogenese. Nach Fujumura kann jedoch durch Applikation von Zeatin die somatische Embryogenese in einer Karottenzellkultur gefördert werden (41,42). Andere Cytokinine wie Benzylaminopurin oder Kinetin hatten dagegen einen hemmenden Einfluß auf die Embryogenese in diesem System; Zeatinkonzentrationen größer 10^{-7} M wirkten auch hemmend. Aus der Literatur(44) war bekannt, daß *Phaseolus coccineus* Embryonen, isoliert aus Samen, bei einer *in vitro* Inkubation mit Zeatin (10^{-7} - 10^{-5} M) ein verstärktes Längenwachstum zeigten. Zeatinribosid war dagegen nur in einem früheren Embryonalstadium in Konzentrationen von 10^{-12} - 10^{-10} M positiv wirksam, höhere Konzentrationen waren inhibitorisch.

Im verwendeten Aniszellkultursystem (An 180) traten starke Schwankungen primär in der Isopentenyladenin-Gruppe auf (siehe 3.2.2.3, 3.2.3.2). Um den Einfluß dieser Cytokiningruppe auf die Aniszellkultur zu testen, wurde daher sowohl Isopentenyladenin, als auch Isopentenyladenosin einer proembryonalen und embryonalen Kultur zugefügt.

3.3.1 Einfluß von Isopentenyladenin und Isopentenyladenosin auf die somatische Embryogenese

Inwieweit beeinflussen exogen zugesetzte Cytokine die somatische Embryogenese in Aniszellkulturen? Zur Klärung dieser Frage wurde Isopentenyladenosin und Isopentenyladenin der Zellkultur appliziert. Als Konzentrationsbereich wurde 5×10^{-6} - 5×10^{-8} M gewählt, da die gefundene endogene Konzentration ein Maximum von ca. 50 ng Isopentenyladenosin /g Fg. = $1,5 \times 10^{-7}$ Mol Isopentenyladenosin/kg Fg. aufwies.

Die Versuche wurden in Petrischalen (60 x 15 mm), mit einem Kulturvolumen von 10 ml durchgeführt und dreifach angesetzt. Die Anfangszelldichte war immer $1,2 \times 10^5$ Zellen/ml. Tabelle 19 zeigt den Einfluß unterschiedlicher Cytokininkonzentrationen auf die Embryonenbildung. Bis zum 4.Tag nach Induktion der Embryogenese hemmten Isopentenyladenosin- und Isopentenyladenin-Konzentrationen von 5×10^{-6} M die *in vitro* Embryonenbildung um fast 50 %. Konzentrationen von 5×10^{-7} M waren annähernd unwirksam, wohingegen Konzentrationen von 5×10^{-8} M eine Erhöhung der Gesamtembryonenzahl bewirkten. Morphologisch interessant war das Auftreten wesentlich kleinerer globulärer Embryonen, sowie eine erhöhte Anzahl vakuolisierter Zellen bei Konzentrationen von 5×10^{-6} M, im Vergleich zu den Kontrollgruppen.

Tabelle 19. Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen von Isopentenyladenosin (i6Ado) und Isopentenyladenin (i6Ade) auf die Embryogenese. Die Anfangszelldichte betrug $1,2 \times 10^5$ Zellen/ml, das Kulturvolumen 10 ml. Die angegebenen Werte entsprechen dem Mittelwert aus je 3 Ansätzen. Standardabweichung: $\pm 10\%$ - $\pm 20\%$.

Cytokinin (M)	Embryos/Petrischale	
	nach 4 Tagen	nach 6 Tagen
5×10^{-6} (i6Ade)	913	3675
5×10^{-7} "	1804	4388
5×10^{-8} "	2039	4631
5×10^{-6} (i6Ado)	1023	3964
5×10^{-7} "	1806	4572
5×10^{-8} "	2055	4635
Kontrolle	1954	3838

Am 6.Tag nach Induktion der Embryogenese war der inhibitorische Einfluß von 5×10^{-6} M nicht mehr so ausgeprägt, während der positive Einfluß von 5×10^{-8} M geblieben war. Ebenso zeigten nun Konzentrationen von 5×10^{-7} M einen fördernden Einfluß auf die Embryobildung.

Um eine mögliche zeit- und wachstumsabhängige Sensitivität der Zellen in Bezug auf die applizierten Cytokine zu testen, wurde in einer weiteren Versuchsreihe zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Induktion der Embryogenese Isopentenyladenosin, bzw. Isopentenyladenin den Kulturen zugesetzt (Tabelle 20).

Tabelle 20. Einfluß von Isopentenyladenosin (i6Ado) und Isopentenyladenin (i6Ade) auf die Embryogenese. Die Cytokine wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Induktion der Embryogenese zugesetzt. Die Konzentration war jeweils 5×10^{-8} M. Ausgewertet wurde am 6.Tag nach Embryogeneseinduktion. (Bedingungen wie in Tab.19). (Kontrolle: 3838 Embryonen/Petrischale).

Zeitpunkt nach Induktion (Tage)	Embryos/Petrischale	
	i6Ade	i6Ado
0	4631	4635
1	4803	4725
2	5640	5499
3	4762	4617
4	3509	3936

Der fördernde Einfluß von Isopentenyladenosin und Isopentenyladenin auf die Embryonenbildung stieg bis zum 2.Tag nach Induktion der Embryogenese an, um dann wieder abzufallen. Ab dem 4.Tag war kein Einfluß mehr erkennbar. Die Zellen waren damit nicht mehr sensitiv gegenüber Isopentenyladenosin und Isopentenyladenin. Bezüglich der einzelnen Embryonalstadien konnte kein Unterschied festgestellt werden. Unabhängig vom Zeitpunkt der Cytokininapplikation lag der Anteil der globulären Embryos bei 78-82%, der Anteil der herz- und torpedoförmigen betrug 18-22%.

Da die maximale Wirkung der applizierten Cytokinine mit der log-Phase des Wachstums korreliert war, lag die Vermutung nahe, daß die vermehrte Bildung von Embryonen durch eine gesteigerte Zellteilungsaktivität bedingt war. Nach Huber et al.(53) kann in Aniszellkulturen durch Erhöhung der Anfangszelldichte ebenfalls eine vermehrte Embryonenbildung induziert werden.

3.3.2 Einfluß von Cytokinin auf eine proembryonale Kultur

Unterschiedliche Konzentrationen von Isopentenyladenosin und Isopentenyladenin wurden den Kulturen zugesetzt und die Zelldichten zu verschiedenen Zeitpunkten nach Subkultivation bestimmt (Tabelle 21).

Tabelle 21. Einfluß von Cytokinin auf das Zellwachstum einer proembryonalen Kultur. Das Kulturvolumen war 50 ml, die Anfangszelldichte wurde auf 8×10^4 Zellen/ml eingestellt. Die Ergebnisse sind die Mittelwerte aus 2 Versuchsreihen. (n.d. = nicht durchgeführt). i6Ade=Isopentenyladenin, i6Ado=Isopentenyladenosin

Konzentration (M)	Zelldichte ($\times 10^5$ Zellen/ml)	
	48 h	90 h
4×10^{-6} (i6Ade)	1,20	n.d.
4×10^{-7} "	1,71	2,09
4×10^{-8} "	1,62	2,09
4×10^{-6} (i6Ado)	1,26	n.d.
4×10^{-7} "	1,46	2,05
4×10^{-8} "	1,49	2,04
Kontrolle	1,17	1,86

Konzentrationen von Isopentenyladenin und Isopentenyladenosin von 4×10^{-6} M hatten fast keinen Einfluß auf das Zellwachstum. Konzentrationen von 4×10^{-7} und 4×10^{-8} M bewirkten dagegen eine erhöhte Zelldichte nach 48 h Inkubation. Nach 90 h Inkubation war dieser Effekt abgeschwächt, aber noch nachweisbar vorhanden (Tabelle 21).

Ähnliches wurde von Mackenzie berichtet (77): Cytokinin-konzentrationen von 10^{-8} bis 10^{-6} M förderten das Zellwachstum in Acer pseudoplatanus Zellkulturen, wohingegen höhere Konzentrationen nur einen schwach stimulierenden Einfluß hatten.

3.4 Extraktion und Identifizierung eines neuen, natürlich vorkommenden Cytokinins (6-Benzylaminopurinribosid) in Aniszellkulturen

Für den Start einer Kultur (siehe unter 2.2) wurden als Inoculum jeweils alte Zellen eingesetzt. Der Biotest eines Zellextraktes nach Sephadex LH-20 Chromatographie ergab eine aktive Fraktion im Elutionsbereich von Isopentenyladenin / Benzyladenosin. Weitere Untersuchungen mittels Gaschromatographie und Massenspektroskopie zeigten jedoch, daß es sich nicht um Isopentenyladenin, sondern um 6-Benzylaminopurinribosid handelte.

Synthetische 6-Benzylaminopurine sind seit langem als künstliche Cytokinine bekannt. Ihre Cytokininaktivität wurde von Letham zusammenfassend beschrieben (25). Bis heute wurden nur zwei natürlich vorkommende 6-Benzylaminopurine gefunden: 6-(o-hydroxybenzylamino)-9 β -D-ribofuranosylpurin wurde aus Blättern von *Populus robusta* (78) und 6-(o-hydroxybenzylamino)-2-methylthio-9 β -D-glucofuranosylpurin aus Früchten von *Zantedeschia aethiopica* (79) isoliert.

Das aus einer Aniszellkultur extrahierte 6-Benzyladenosin ist somit der dritte Nachweis eines natürlich vorkommenden 6-Benzylaminopurins und der erste Nachweis für ein Cytokinin mit einem nichtsubstituierten Benzylring.

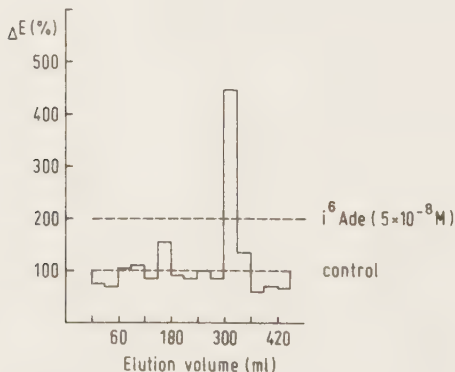


Abb. 21. Amaranthus-Betacyan-Biotest von gereinigten proembryonalen Aniszellextrakten nach einer Sephadex LH-20 Chromatographie. Die Hauptcytokininaktivität lag im Elutionsbereich von Isopentenyladenin/Benzyladenosin. ($i^6 Ade$ = Isopentenyladenin).

Für die Extraktion und Identifizierung wurden ca. 100 g proembryonale Zellen verwendet. Die Extraktion erfolgte entsprechend der konventionellen Methode A über Ionenaustauschchromatographie, Lösungsmittelverteilung und Sephadex LH-20 Chromatographie (siehe 2.3.1). Fraktionen der LH-20 Chromatographie wurden im Bioassay getestet (Abb.21). Im Elutionsbereich von Isopentenyladenin und Benzyladenosin konnte die aktivste Fraktion ermittelt werden. Dieser Elutionsbereich wurde nach Trimethylsilylierung gaschromatographiert und massenspektrometrisch ausgewertet. Neben anderen TMS-Kohlenhydraten konnte auf Grund der Retentionszeit (11 min.) und dem Massenspektrum (Abb.22) 6-Benzylaminopurinribosid identifiziert werden. Das Massenspektrum war identisch mit dem eines authentischen Benzyladenosin.

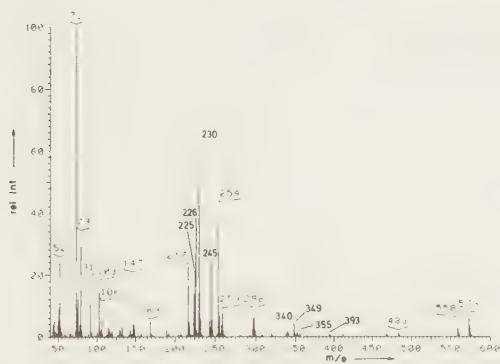


Abb. 22. Massenspektrum der extrahierten cytokininaktiven Verbindung, in Form des TMS-Derivats (Erläuterungen im Text).

Die Fragmentation bewies die Struktur von Benzyladenosin. Von dem Molekölion m/e 573 wurde der Verlust eines Methylradikals (m/e 573 $\rightarrow$ m/e 558) und der Verlust von zwei Trimethylsilanol-Molekülen (m/e 573 $\rightarrow$ m/e 483 $\rightarrow$ m/e 393) beobachtet. Die Ionen m/e 349, 259, 243, 230, 217 und 147 bewiesen die Anwesenheit eines trimethylsilylierten Ribosids (66). Ionen, welche das substituierte Purin-Gerüst enthalten, sind in Abb.23 zusammengefaßt. Die Ionen b und b' stellen den substituierten Purinkern dar, während die Ionen c und d den ansteigenden Anteil der Kohlenhydrathälfte repräsentieren. Das Ion m/e 298 wurde durch eine Neuordnung eines Protons an die Trimethylsilylgruppe der Base nach Bruch der Ribosid-Bindung gebildet. Das Ion m/e 91 bewies die Anwesenheit der Benzylseitenkette.

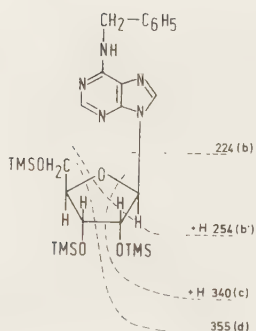


Abb. 23. Fragmentationsmuster von 6-Benzylaminopurinribosid, in Form des TMS-Derivats.

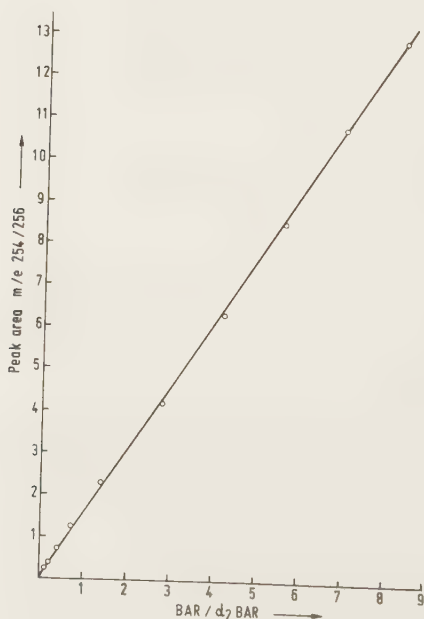


Abb. 24. SIM-Eichkurve von 6-Benzylaminopurinribosid, in Form der TMS-Derivate.

Um dieses neue Cytokinin auch quantitativ zu erfassen, wurde ein deuteriertes Analogon von Benzyladenosin synthetisiert. Dies erfolgte durch Reduktion von Benzonitril mit LiAlD₄ zu d2-Benzylamin und anschließende Reaktion mit 6-Chlorpurinribosid zu d2-Benzyladenosin (siehe unter 2.6.3). Für SIM-Messungen wurden die Fragmentationen von Benzyladenosin (m/e 254) und d2-Benzyladenosin (m/e 256) verwendet. Die Eichkurve ist in Abb.24 dargestellt.

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Kulturbeginn wurden die Zellen geerntet und eine definierte Menge an d2-Benzyladenosin vor der Homogenisierung zugesetzt (Tabelle 22). Die Extraktion der Zellen erfolgte zunächst mit der Methode A (siehe 2.3.1). Nach Sephadex LH-20 Chromatographie (26x2 cm) wurde das Elutionsvolumen von authentischem Benzyladenosin durch SIM-Messungen weiter untersucht.

Tabelle 22. Quantifizierung von Benzyladenosin mittels GC/MS in Aniszellen während des Wachstum. (- = nicht nachweisbar). BAR=Benzyladenosin.

Zeit(h)	Fg.(ng)	d2-BAR(ng)	m/e 254/256	BAR(ng/g Fg.)
---------	---------	------------	-------------	---------------

64	17,38	175	-	-
96	15,09	140	-	-
134,5	17,57	140	-	-
256	22,63	280	-	-
408	32,72	560	-	-

Das Medium wurde, wie bereits für Isopentenyladenosin und Isopentenyladenin beschrieben, nach Zusatz von je 175 ng d2-Benzyladenosin über Cellulosephosphat-Chromatographie, Lösungsmittelverteilung, sowie Sephadex LH-20 Chromatographie extrahiert und gereinigt. Fraktionen coeluiert mit Standard-Benzyladenosin wurden dann durch SIM-Messungen analysiert. Eine Auswertung dieser "Medium-Spektren" war wegen störender Komponenten jedoch nicht möglich. Überraschenderweise wurde in den Zellen während einer normalen Wachstumsphase kein Benzyladenosin gefunden (Tabelle 22). Benzyladenosin konnte nur in Kulturen mit einer extrem hohen Zelldichte nachgewiesen werden (mindestens 5×10^6 Zellen/ml), welche durch Entfernung von altem Medium und Zugabe von neuem Medium erreicht wurden. Dies mußte mehrmals wiederholt werden. Die geernteten Zellen zeigten dann nicht mehr die normalerweise auftretende hellgelbe/weiße Farbe, sondern waren hellbraun / braun. Quantitätsbestimmungen von Benzyladenosin in nach der Methode C über Sep-Pak-C18 Säulen und HPLC gereinigten Zellextrakten (siehe 2.3.3), ergaben bis zu 22 ng Benzyladenosin/g Fg. (Tabelle 23).

Tabelle 23. Benzyladenosin(BAR)-Bestimmung mittels SIM-Messungen von zwei verschiedenen Extraktionen.

Zellmenge d2-BAR m/e 254/256 BAR/d2-BAR ng/g Fg.

10 g	70 ng	4,84	3,15	22
103 g	670 ng	1,50	1,00	6,8

Die physiologische Rolle von diesem Cytokinin ist nicht klar, da zum Zeitpunkt des Auftretens kaum noch Zellteilungsvorgänge stattfinden. Wie schon unter 1.2.4 ausgeführt, besteht die auffallendste physiologische Wirkung von Cytokinen in der Förderung von Zellteilungen in Kallusgeweben. Würde Benzyladenosin eine Rolle bei dem Zellwachstum spielen, müßte es während der log-Phase auftreten, was aber nicht der Fall war. Man könnte zunächst annehmen, daß Benzyladenosin nur ein Nebenprodukt im Metabolismus von alten Aniszellkulturen, unter derart extrem unphysiologischen Bedingungen, darstellt. In diesem Zusammenhang sind jedoch die Arbeiten von Mackenzie et al.(77) interessant: in einer Berg-Ahorn-Zellkultur hatte Benzylaminopurin, im Gegensatz zu anderen Cytokinen, keinen förderenden Einfluß auf das Zellwachstum, wirkte ab einer Konzentration von 5×10^{-7} M sogar inhibitorisch. Nach Gilbert et al.(107) wird in etioliierten Bohnenkeimlingen der Beginn der Kotyledonen-Seneszenz durch die Applikation von Benzylaminopurin verzögert; weiterhin fanden Horgan et al. o-HO-Benzyladenosin nur in solchen Zellen, die keine Zellteilungsaktivität mehr zeigten (78). Von diesen Autoren wurde ein retardierender Effekt von o-HO-Benzyladenosin auf die Blattseneszenz diskutiert. Benzyladenosin kann somit durchaus einen allgemeinen Seneszenzretardierungsfaktor in altem Pflanzengewebe darstellen.

3.5 Cytokininbindendes Protein

Cytokininbindende Proteine wurden von mehreren Autoren bereits beschrieben. Mit Hilfe der Affinitätschromatographie konnte im Cytosol verschiedener Pflanzen ein cytokininbindendes Protein nachgewiesen werden (51,54,70,71,74). Ferner konnte durch Zentrifugation von Pflanzenhomogenaten eine cytokininbindende Fraktion gefunden werden (48,72,73).

Da in der verwendeten Aniszellkultur endogene Cytokinine nachgewiesen werden konnten, war es prinzipiell interessant, festzustellen, ob auch ein cytokininbindendes Protein vorhanden sei. Dazu wurde eine 80.000 x g subzelluläre Niederschlag-Fraktion von Zellextrakten hergestellt, die dann bezüglich ihrer Bindungseigenschaften getestet wurde.

3.5.1 Bindungstest

1 ml der 80.000 x g Fraktion, gelöst in Bindungspuffer wurde mit 0,058 μCi ^{14}C -Benzylaminopurin (10^{-6} M) für 1 h bei 4 °C inkubiert und anschließend auf einer Sephadex G-25 Säule filtriert. Die Radioaktivität, welche zusammen mit der Proteinfraction eluierte, wurde als gebunden betrachtet. In Abb.25 (oberes Bild) ist eine solche Gelfiltration dargestellt und, wie ersichtlich, konnte der Proteinfraction eine signifikant erhöhte Radioaktivität zugeordnet werden. Die Hauptmenge des nichtgebundenen ^{14}C -Benzylaminopurin erschien erst nach 10 ml Elutionsvolumen. Kontrollversuche, durchgeführt mit Rinderserumalbumin, zeigten dagegen keine Radioaktivität im Bereich der Proteinfraction (Abb.25, unteres Bild).

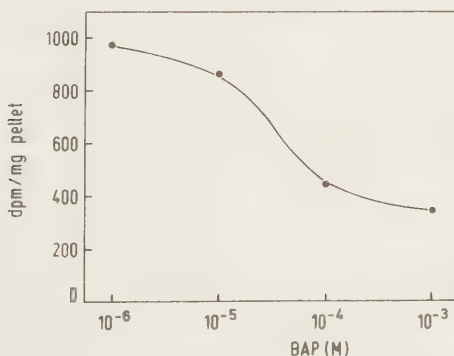


Abb.26. Kompetetive Bindung von ^{14}C -Benzylaminopurin in einer 80.000 x g Fraktion. Die Fraktion wurde für 1 h bei 0 °C mit ^{14}C -Benzylaminopurin (10^{-6} M) gegen eine steigende Konzentration an unmarkiertem Benzylaminopurin (BAP) inkubiert und dann einer Sephadex G-25 Gelfiltration unterworfen.

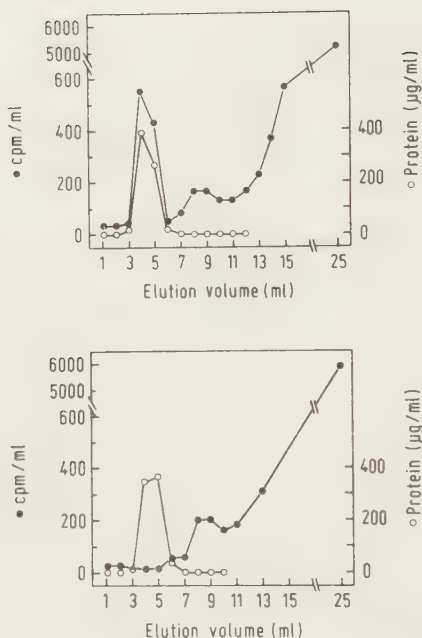


Abb. 25. Bindungsassay der 80.000 x g Fraktion (oben). 1 ml der Zellfraktion wurde mit ^{14}C -Benzylaminopurin (10^{-6} M, 0,058 μCi) inkubiert und nach 1 h auf einer Sephadex G-25 Säule (8 x 1,2 cm) chromatographiert. Es wurden 1 ml Fraktionen gesammelt, davon wurde die Radioaktivität von 0,9 ml, nach Zusatz von Rotiszint 22, bestimmt und 0,1 ml für die Proteinbestimmung eingesetzt. Ein Kontrollversuch mit BSA ist im unteren Bild dargestellt.

Kompetitive Bindungsstudien mit kaltem Benzylaminopurin im Bereich von 10^{-3} M bis 10^{-6} M ergaben eine Verdrängung des markierten Benzylaminopurin in der 80.000 x g Zellfraktion (Abb. 26). Da diese graphische Darstellung keine Aussagen über die Bindungseigenschaften ermöglicht, wurden die Werte der Standardkurve in einen "Scatchard-Plot" (80) übertragen. In einem "Scatchard-Plot" wird der Quotient aus den Konzentrationen an gebundenen Liganden und freien Liganden gegen den Anteil an gebundenen Liganden aufgetragen. Ist das Protein bezüglich seiner Bindungsstellen einheitlich, so ergibt sich eine Gerade, aus deren Steigung die Dissoziationskonstante abgeleitet werden kann.

Wie aus Abb.27 jedoch ersichtlich ergab sich eine nichtlineare Funktion, d.h.: es müssen unterschiedliche Bindungseigenschaften eines Proteins vorhanden sein. Der relativ hohe K_D -Wert von $8,3 \times 10^{-5}$ M, ermittelt aus der Tangentensteigung in der Abszisse deutete auf eine niedrige Bindungsaffinität des Proteins zu Benzylaminopurin hin.

In der Literatur sind prinzipiell zwei unterschiedliche Bindungsstellen beschrieben: eine niedrige Affinität von 9×10^{-3} M bis 8×10^{-6} M (48,71,72,86)) und eine hohe im Bereich von 10^{-7} M bis 4×10^{-8} M (48,54,72,74,86)). Die hohe Bindungsaffinität konnte in Zellfraktionen jedoch nur dann nachgewiesen werden, wenn die spez.Akt. des eingesetzten Cytokinins größer 10 Ci/mMol war (72).

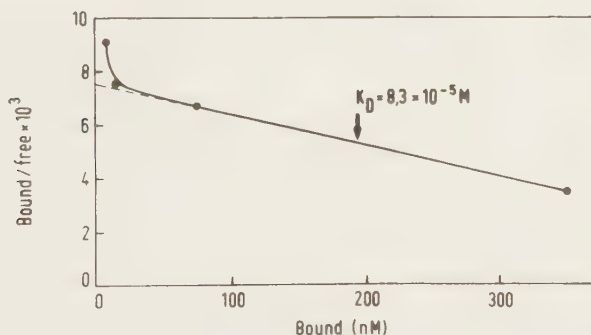


Abb.27. Scatchard Plot der Cytokinin-Bindung. Die Werte aus Abb.26 wurden entsprechend der Methode nach Scatchard (80) aufgetragen. $K_D = 8,3 \times 10^{-5}$ M.

Auf Grund der ermittelten niedrigen Bindungsaffinität konnte zunächst eine unspezifische Bindung, wie sie von Gardner (73) für eine Cytokininbindung an Talcum Puder beschrieben wurde, nicht ausgeschlossen werden. Es wurden daher Untersuchungen bezüglich der Bindungsspezifität dieser 80.000 x g Fraktion durchgeführt (Tabelle 24).

Tabelle 24. Spezifität der Cytokininbindung der 80.000 x g Fraktion von Anisgallen. Die Konzentration an ^{14}C -Benzylaminopurin war 10^{-6} M (0,058 μCi), die nicht markierten Cytokinine lagen in einer Endkonzentration von 10^{-4} M vor. BAP=Benzylaminopurin, BAR=Benzyladenosin, i6Ade=Isopentenyladenin, i6Ado=Isopentenyladenosin, i6Ade=Zeatin.

Cytokinin ^{14}C -BAP gebunden (%)

-	100
BAP	38
BAR	83
i6Ade	42
i6Ado	82
i6Ade	56

Es zeigte sich, daß Isopentenyladenin und Benzylaminopurin eine Verminderung der Bindung um ca. 60 % bewirkten. Zeatin ist als Kompetitor nicht so effektiv (Reduktion der Bindung um 44 %). Die entsprechenden 9-Riboside hatten dagegen eine schwache Affinität zu der 80.000 x g Fraktion. Auf Grund der schwachen Konkurrenz von Cytokinin-9-Ribosiden im Bereich von 10^{-4} M ist eine nichtspezifische Bindung unwahrscheinlich. Ein ähnliches Verhalten wurde von Gardner für eine 80.000 x g Fraktion von *Funaria hygrometrica* (73) und von Sussman für eine entsprechende Fraktion aus Tabakzellen (72) beschrieben.

3.5.2 Affinitätschromatographie

Da die Bindungsstudien an der 80.000 x g Fraktion erfolgreich verliefen, wurde mit Hilfe einer Affinitätschromatographie versucht, eine Reinigung des vermutlichen Proteins durchzuführen (Abb.28). Als Affinitätsmatrix diente Sepharose 4B, an die über Adipinsäurehydrazid-Gruppen Isopentenyladenosin gebunden war (Sepharose-Isopentenyladenosin). Eingesetzt wurden jeweils ca. 11 mg Protein der Zellfraktion. Die Inkubation mit Sepharose-Isopentenyladenosin erfolgte bei 4 °C über Nacht. Nach einer 100 x g Zentrifugation blieb die Hauptmenge an Protein im Überstand (ca. 10 mg). Die Waschfraktion der Affinitätssäule enthielt ca. 700 μg Protein und die Elutionsfraktion ca. 400 μg Protein. Die Elutionsfraktionen 1-10 wurden vereint, zunächst gegen 10 mM Phosphatpuffer, dann gegen Wasser dialysiert und nach Lyophilisation bei -70 °C aufbewahrt.

Eine SDS-Gel-Elektrophorese der Elutionsfraktion ergab ein komplexes Bandenmuster. Ein Vergleich mit der Überstandsfraction zeigte eine Anreicherung von 3 Banden im Molekulargewichtsbereich von 21.500 - 68.000 (Abb.29).

Vergleiche mit Molekulargewichten anderer, aus der Literatur bekannter cytokininbindender Proteine sind wenig sinnvoll, da, abhängig vom untersuchten Material, Molekulargewichte von 4.000 - 123.000 gefunden wurden (51,54,70,71,74 Sektion 3).

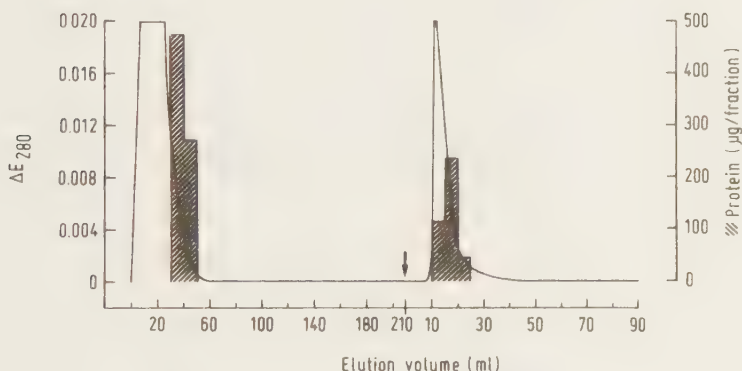


Abb. 28. Sepharose-Isopentenyladenosin Affinitätschromatographie einer 80.000 x g Fraktion. Nach Inkubation der Fraktion mit Sepharose-Isopentenyladenosin wurde das Gel in eine Säule gefüllt und mit 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,6) gewaschen. Der Pfeil markiert den Pufferwechsel: die Säule wurde mit 50 mM Phosphatpuffer (pH 8), der 1 M KCl enthielt, eluiert. Es wurden 5 ml Fraktionen gesammelt.



Abb.29. SDS-Gel-Elektrophorese (9-18 %) des von der Affinitätssäule eluierten Proteins. Aufgetragene Proben sind von links nach rechts: 1) Standards: BSA(68.000), Trypsin-Inhibitor(21.500), Cytochrom c(12.500). 2) eluiertes Protein: 15 µg. 3) eluiertes Protein: 7,5 µg. 4) Inkubationsüberstand: 7,5 µg. 5) Inkubationsüberstand: 5 µg. 6) Standards. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Spannung (120 V) durchgeführt.

Bindungsstudien mit der Elutionsfraktion (ca. 100 µg Protein) waren erfolglos. Der Bindungsassay wurde wie beschrieben durchgeführt, als Bindungsassaypuffer wurde jedoch der Inkubationspuffer der Affinitätschromatographie (10 mM Phosphatpuffer) eingesetzt. Die Ursache für diesen Verlust der Bindungskapazität dürfte in der Verwendung von 1M KCl als Elutionsmittel liegen. Versuche einer Elution der Affinitätssäule mit Isopentenyladenin waren erfolglos: bei Konzentrationen $> 10^{-4}$ M konnte Isopentenyladenin nicht vollständig gelöst werden, und geringere Konzentrationen an Isopentenyladenin ergaben keine Protein-Elution. Erst durch die Erhöhung der Ionenkonzentration (1 M KCl) konnte wieder eine Proteinfraction von der Säule eluiert werden.

Weitere Reinigungsschritte, durchgeführt vor der Affinitätschromatographie sollten jedoch mehr Klarheit bezüglich dieses cytokininbindenden Proteins bringen.

4. DISKUSSION

Cytokinine spielen eine wichtige Rolle bei Zellteilungen und Zelldifferenzierungen. So ist aus der Literatur bekannt, daß in einer Zellkultur von Acer pseudoplatanus durch Zugabe von Cytokinen eine erhöhte Zelldichte im Vergleich zu Kontrollkulturen ohne exogenes Cytokinin festgestellt werden kann (77). In stationären Sojabohnenzellkulturen kann durch Applikation von Zeatin eine Erhöhung der mitotischen Aktivität induziert werden (85). Die asymmetrische Zellteilung in Funaria hygrometrica, die dann zur Knospenbildung führt, wird durch Cytokinine stimuliert (83). In Gegenwart von Indolelessigsäure ist die Bildung von Tracheenelementen in Erbsen-Wurzel-Kallus-Segmenten durch Kinetinapplikation stark erhöht (32). Zellteilungen und Xylem-Differenzierung werden in Parenchym-Explantaten von Jerusalem Artischocken bei optimalen Auxinkonzentrationen gefördert (31). Als klassisches Beispiel von Differenzierungsvorgängen sind die Ausbildungen von Wurzeln und Sprossen in Tabak-Kallusgewebe anzuführen, welche durch das Verhältnis Auxin/Cytokinin regulierbar sind (2,3).

Endogene Cytokininspiegel von Pflanzenzellkulturen konnten in den bisher beschriebenen Fällen mit einer erhöhten mitotischen Aktivität bzw. mit der log-Phase des Zellwachstums korreliert werden (16,18,19).

Über endogene Cytokininspiegel während der Embryogenese war bisher wenig bekannt. Die Entwicklung von Phaseolus coccineus L. Embryonen, isoliert aus den Samen, konnte durch Applikation von Zeatinribosid oder Zeatin gefördert werden (44). Für die Entwicklung des Embryos war in diesem System eine Hormonversorgung durch den Suspensor notwendig (39). Auch in Zea mays konnte das für die Embryonalentwicklung notwendige Endosperm durch Cytokinine ersetzt werden (38).

Für das Studium endogener Cytokinine während der Embryogenese eignen sich besonders gut cytokininautotrophe Zellkultursysteme. Das in vitro Embryogenese-Muster derartiger Zellkulturen ist bezüglich der einzelnen Entwicklungsstadien gut vergleichbar mit dem einer in vivo Embryogenese. Al-Abta und Collins (61) berichteten über unterschiedliche Cytokininspiegel in einer Selleriezellkultur während der Embryogenese. Diese Zellkultur war jedoch nicht völlig cytokininautotroph. Fujumura und Komamine konnten in einer Karottenzellkultur durch Zeatinapplikation eine Erhöhung der Embryonenzahl erzielen (41,42).

Vergleichende Untersuchungen in embryonalen und proembryonalen Zellkulturen zur Klärung der Cytokininbedeutung während der Embryogenese wurden, soweit mir bekannt ist, bis heute noch nicht durchgeführt. Als in vitro System wurde eine cytokininautotrophe Aniszellkultur verwendet, da in dieser Suspensionskultur durch Transfer der Zellen auf ein chemisch definiertes

Medium, die Embryogenese gezielt induziert werden konnte. Im Vergleich mit einer embryogenen Karottenzellkultur (C975) zeigten Aniszellkulturen jedoch eine wesentlich kürzere Wachstumsphase (94) und wurden mit aus diesem Grund untersucht.

Für die Identifizierung und Quantifizierung von Cytokinen gibt es 3 Haupttechniken: 1) den Biotest, 2) den Radioimmunoassay und 3) die Gaschromatographie/Massenspektroskopie in Verbindung mit der Isotopenverdünnungsmethode.

Mit allen drei Methoden konnte eine isopentenyladenosin-ähnliche Substanz identifiziert werden. Bezüglich der Quantifizierung wurde jedoch nur für den RIA und die SIM-Messungen eine gute Übereinstimmung gefunden, während der Bioassay Ergebnisse brachte, die nicht befriedigend waren.

Die in dieser Aniszellkultur durch den Bioassay ermittelte cytokininaktive Substanz konnte durch Massenspektroskopie eindeutig als Isopentenyladenin identifiziert werden (Abb.10), ferner konnte im Biotest eine schwache Aktivität für ein zeatinähnliches Cytokinin nachgewiesen werden. Für weitere Untersuchungen, speziell mit proembryonalen Kulturen, erwies sich der biologische Test als nicht befriedigend. Bei einer Nachweisgrenze von 20 ng mußten bis zu 100 g Zellen aufgearbeitet werden. Da das Frischgewicht der Zellen / Fernbachkolben zu Beginn einer Kultur nur im Bereich von 1g/Fernbachkolben lag, waren Bioassay-Untersuchungen schon aus praktischen Gründen kaum durchführbar. Desweiteren ist beim biologischen Test immer mit Interferenzen von anderen Substanzen, sowie einer unterschiedlichen Sensitivität gegenüber verschiedenen Cytokinen zu rechnen (43,59,60,93). Für eine exakte Quantifizierung ist der Bioassay somit nicht verwendbar. So würden die während der Embryogenese abgeschätzten Cytokininwerte für eine Beteiligung von Isopentenyladenin an der Embryonalentwicklung sprechen (Tabelle 3), da der Anstieg der Isopentenyladenin-Konzentration auf 6,4 ng/g Fg. mit der Ausbildung herzförmiger Embryonen korreliert werden konnte. Eine ähnliche quantitative Veränderung des Cytokinniveaus während der Embryogenese in Selleriekulturen wird von Al-Abta und Collin (61) beschrieben. Die Autoren verwendeten jedoch ebenfalls einen Biotest und führten keine Kontrollversuche mit proembryonalen Zellen durch.

Diese Nachteile des Bioassay hatte der Radioimmunoassay nicht. Bei einer Nachweisgrenze von 0,1-0,2 ng/g Fg., sowie einer hohen Selektivität gegenüber unterschiedlichen Cytokiningruppen (Tabelle 5), konnten entsprechende Reihenuntersuchungen durchgeführt werden. Für die proembryonale Kultur (+ 2,4-D) ergab sich ein drastischer Anstieg der Cytokininaktivität während der log-Phase des Wachstums (Tabelle 8a und Abb.14a). Für Isopentenyladenosin wurde ein Anstieg von 0,3 ng/g Fg. auf 58,3 ng/g Fg. während der ersten 3 Tage nach Subkultivation

und ein allmählicher Abfall auf 0,9 ng/g Fg. im weiteren Verlauf des Zellwachstums gefunden. Das Isopentenyladenin-Niveau erreichte ebenfalls ein Maximum nach 2-3 Tagen von 7,9 ng/g Fg. Zwischen dem 5. und 6. Tag der Kulturphase traten dann polare Cytokinine vom Isopentenyladenin-Typ auf. Auch für Zeatin wurde das Maximum nach 2-3 Tagen mit 11,1 ng/g Fg. ermittelt. Für die polaren Zeatine, einschließlich von Zeatinribosid ergab sich der höchste Wert, entsprechend den polaren Isopentenyladenin-ähnlichen, auch erst nach dem 5. Tag mit 8.9 ng/g Fg. Die Resultate stimmten mit anderen Berichten über endogene Cytokininspiegel während des Zellwachstums gut überein. Zum Zeitpunkt einer hohen Zellteilungsaktivität lag in einer Berg-Ahornkultur das Maximum bei 8 ng Kinetin-Äquivalenten/g Fg. (19), in einer Erbsenwurzelkultur bei 330 ng Kinetin-Äquivalenten/g Fg. (18) und in einer Tabak-Zellkultur bei 5 ng/g Fg. (16). Die divergierenden Cytokininmengen sind auf das unterschiedliche Pflanzenmaterial, sowie auf verschiedene Cytokininbestimmungsmethoden zurückzuführen. Das Maximum war jedoch in allen Fällen immer mit der log-Phase, bzw. einer hohen mitotischen Aktivität korreliert.

Überraschenderweise wurde in einer embryonalen Aniszellkultur (-2,4-D) das gleiche Cytokininverteilungsmuster gefunden. So ergab sich für Isopentenyladenosin ebenfalls ein Maximum in der frühen Wachstumsphase mit 4 ng/g Fg. und ein Abfall auf ca. 1 ng/g Fg. im weiteren Verlauf der Embryogenese. Für Isopentenyladenin war der Anstieg auf 1,4 ng/g Fg. nach 48 h nicht so ausgeprägt. Polare Isopentenyladenin-ähnliche Cytokinine konnten auch erst zum Zeitpunkt des Isopentenyladenosin Maximums, bzw. später gefunden werden (Tabelle 8b, Abb.14b). Auffallend war jedoch, daß die Mengen aller isopentenyladenin-ähnlichen Cytokinine in der embryonalen Kultur wesentlich geringer waren, im Vergleich zu der proembryonalen Kultur. Für Zeatin und polare Zeatine ergab sich das entsprechende Verteilungsmuster wie in der proembryonalen Kultur, jedoch ebenfalls mit etwas reduzierten Mengen.

Versucht man eine Korrelation der endogen embryonalen Cytokinine mit der Bildung einzelner Embryonalstadien (Tabelle 7, 8b) herzustellen, so ergibt sich folgendes Bild: mit dem Beginn der globulären Embryonalphase (48 h) konnte ein Anstieg an Isopentenyladenosin (4 ng/g Fg.), Isopentenyladenin (1,4 ng/g Fg.) und Zeatin (3,6 ng/g Fg.) festgestellt werden. Im weiteren Verlauf der Embryogenese fielen die Niveaus wieder auf ca. 1 ng/g Fg. ab. Polare Cytokinine waren in verstärktem Maß erst bei den globulären Embryos und später feststellbar und sanken dann auch auf Null ab. Es ist somit durchaus eine quantitative, sowie qualitative Änderung des Cytokininspiegels während der Embryogenese vorhanden. Ähnliches wurde auch von Al-Abta und Collins für Selleriekulturen, mit einem Anstieg der Gesamtcytokinaktivität in reifenden Embryos und einem Abfall in der intakten Pflanze, berichtet (61).

Da in dieser Aniszellkultur sowohl für die embryonale Kultur (- 2,4-D), als auch für die proembryonale Kultur (+ 2,4-D) ein nahezu identisches Cytokininverteilungsmuster gefunden wurde, ist ein direkter Einfluß von Cytokinin auf eine Embryonalentwicklung jedoch nicht sehr wahrscheinlich. In beiden Kulturen (+/- 2,4-D) war das endogene Maximum der freien Cytokinine mit der log-Phase des Wachstums korreliert (Abb.14). Es ist daher, wie auch durch exogene Cytokininapplikation gezeigt werden konnte (Tabelle 19-21), lediglich ein Einfluß auf Zellteilungsaktivitäten vorhanden, sowohl in der proembryonalen, als auch der embryonalen Kultur, unabhängig von der Embryonalentwicklung.

Da die log-Phase einen erhöhten mitotischen Index zeigte (43), ist es durchaus vorstellbar, daß die Cytokinine durch Degradation der t-RNA, die ja ebenfalls in vermehrtem Maß gebildet werden muß, entstanden sind. Nach Literaturangaben liegt die aus t-RNA isolierte Menge an Cytokinin bei 2-300 ng/g Fg., abhängig vom untersuchten Pflanzenmaterial (87,88,95). Nach Klemen und Klämbt beträgt die tägliche Cytokininproduktion einer 18 Tage alten Maispflanze 2×10^{-10} Mol (89). Die in der Aniszellkultur gefundenen maximalen Mengen an Isopentenyladenosin/g Fg. (58 ng für die proembryonale, bzw. 4 ng für die embryonale Kultur) passen somit durchaus in das Schema einer t-RNA Degradation als Entstehungsmöglichkeit für Cytokinine, wobei eine de novo Synthese, wie sie von Chen (90), Burrows (91) und Taya (92) vertreten wird, natürlich nicht ausgeschlossen werden kann.

In einer weiteren Versuchsreihe konnten die durch den RIA ermittelten Cytokininspiegel mit einer völlig anderen Methode (SIM) bestätigt werden. Die Technik der Isotopenverdünnung ergibt neben der exakten Quantifizierung der Cytokinine zusätzlich eine eindeutige Strukturbestimmung (66-68).

In der proembryonalen Kultur ergab sich das Maximum mit 46,9 ng/g Fg. für Isopentenyladenosin ebenfalls während der log-Phase (Tabelle 12, Abb.20a). Isopentenyladenin zeigte ebenfalls einen schwachen Anstieg während des logarithmischen Wachstums (2,2 ng/g Fg.) und im weiteren Wachstumsverlauf einen Abfall auf Wert kleiner 2 ng/g Fg.

In der embryonalen Kultur (- 2,4-D) konnten die endogenen Mengen an Isopentenyladenosin nicht in absoluten Zahlen angegeben werden, da das Verhältnis von Isopentenyladenosin zu d2-Isopentenyladenosin zu klein war, um in den genauen Meßbereich zu fallen. Das Ionenverhältnis m/e 551/553 war jedoch während der log-Phase am größten (Tabelle 11), so daß auch hier das endogene Isopentenyladenosin-Maximum liegen mußte. Das kleine Ionenverhältnis von 0,14 bedeutete auch einen geringeren Isopentenyladenosin-Gehalt für die embryonale Kultur im Vergleich zur proembryonalen Kultur. Die Werte für Isopentenyladenin lagen alle an der Nachweisgrenze, zeigten jedoch eine schwache Erhöhung während des logarithmischen Wachstums (Tabelle 11).

Ein Zusammenhang zwischen erhöhter Cytokininaktivität und Embryonenbildung war auch hier nicht sichtbar. Globuläre Embryonen traten nach 64 h auf und die Ausbildung

herzförmiger Embryos begann zwischen dem 3. und 4. Tag nach Embryogeneseinduktion (Abb. 20b). Zu diesem Zeitpunkt konnte zwar eine leicht erhöhte Cytokininaktivität gemessen werden, doch traf dies in noch stärkerem Maß für die proembryonalen Zellen zu (Abb. 20a).

Die Untersuchung der Zeatin/Zeatinninosid-Fraktion nach der Sephadex LH-20 Chromatographie mittels des Biotest erbrachte nur für die proembryonale Kultur ein schwaches Maximum, ebenfalls während des frühen Wachstums der Zellen (2 ng/g Fg. nach 96 h), ansonsten relativ geringe Werte von 0-1 ng/g Fg. Für die embryonale Kultur ergaben sich annähernd gleichbleibende Werte zwischen 0-1 ng/g Fg. (Tabelle 13). Das Fehlen polarer Cytokinine, sowie die geringen Werte für Zeatin im Vergleich mit den reinen RIA-Untersuchungen sind auf die Verwendung des Bioassays zurückzuführen: 1) das schon erwähnte Auftreten möglicher Inhibitoren 2) Verluste während der Extraktion 3) polare Cytokinine wurden im Bioassay nicht erfasst, da sie eine wesentlich schlechtere Aktivität gegenüber nichtpolaren Cytokinin im *Amaranthus* Biotest haben (93).

Wie schon erwähnt, können Cytokininphosphate als Vorstufen der freien Cytokinine aufgefaßt werden. Sowohl für die embryonale, als auch die proembryonale Kultur ergab sich ein deutlicher Anstieg an phosphatgebundenem Isopentenyladenosin mit 8 ng/g Fg., bzw. 17,4 ng/g Fg. (Tabelle 15, Abb. 20). Dieser Anstieg ging dem Maximum an Isopentenyladenosin zeitlich voraus. Das etwas kleinere Maximum nach 11 bis 13 Tagen ist nicht direkt erklärbar, doch könnten in dieser nichtsynchronisierten Kultur durchaus noch erhöhte Zellteilungsaktivitäten, mit einer vermehrten Bildung von t-RNA, zu diesem Zeitpunkt auftreten. Die phosphatgebundenen Zeatine zeigten keinerlei Veränderung ihres Spiegels und blieben in beiden Kulturen auf minimalen Werten (0 - 0,7 ng/g Fg.; Tabelle 15). Somit ergab sich auch für die phosphatgebundenen Cytokinine kein Zusammenhang mit der Embryonalentwicklung, da sie in beiden Kulturen vorkamen.

Zusammenfassend läßt sich hier schon sagen, daß Cytokinine nicht direkt an Differenzierungsvorgängen während der Embryogenese beteiligt sind, sondern höchstens auf der Ebene von Zellteilungsvorgängen mit dem Wachstum der Aniszellkultur verbunden sind.

Da das Auftreten von Cytokininphosphaten (Isopentenyladenosin-phosphate) in beiden Kulturen dem Maximum der freien Cytokinine voranging, kann die Bildung von Isopentenyladenosin auf eine Abspaltung der Phosphatgruppe zurückgeführt werden. Dies würde auch den in der Literatur beschriebenen Synthesewegen für Cytokinine entsprechen (74, Sektion 1).

Die minimalen Mengen an Isopentenyladenosin, welche im Kulturvolumen der proembryonalen Kultur gefunden wurden (Tabelle 16) haben höchstwahrscheinlich keine physiologische Bedeutung. Der endogene Pool an Isopentenyladenosin ist zu diesem Zeitpunkt um den Faktor 4×10^2 - 4×10^3 größer, als die

exogene Cytokininkonzentration im Medium. Derartige große Unterschiede wurden auch in einer Berg-Ahornkultur gefunden (19). Rückkopplungsmechanismen erscheinen daher ziemlich unwahrscheinlich. Da diese Aniszellkultur jedoch keine synchronisierte Kultur war, kann nicht ausgeschlossen werden, daß exogenes Isopentenyladenosin eine zellteilungsstimulierende Wirkung auf sich noch nicht teilende Zellen ausübt.

Im embryonalen Kulturmedium konnte weder Isopentenyladenosin, noch Isopentenyladenin nachgewiesen werden (Tabelle 17), so daß hier Rückkopplungsmechanismen ausgeschlossen werden können.

Der Zeatinribosid/Zeatin-Gehalt im Medium beider Kulturen lag an der Nachweisgrenze und war zu gering, um eine physiologische Relevanz zu haben (Tabelle 18). Die erhöhten Werte am Ende einer jeweiligen Kulturperiode können als eine allmähliche Akkumulation im Laufe der Zeit aufgefaßt werden. Der endogene Cytokininspiegel war in jedem Fall jedoch wesentlich größer als die exogen im Medium ermittelten Werte.

In diesem Zusammenhang ist es generell interessant, festzustellen, daß der Cytokinengehalt der embryonalen Kulturen im Vergleich zu den proembryonalen Kulturen deutlich niedriger war (während der log-Phase um 1/3 bis 1/12 für freie Cytokine und 1/2 für phosphatgebundene Cytokine). Dafür gibt es zunächst zwei Erklärungsmöglichkeiten: 1) Die Biosyntheserate von Cytokinen ist in proembryonalen Kulturen wesentlich höher, als in embryonalen Kulturen, bzw. der Cytokinabbau ist in embryonalen Kulturen verstärkt. Der Anteil an phosphatgebundenen Cytokinen war für Zeatinribosid in beiden Kulturen annähernd gleich. Für Isopentenyladenosin war er in der embryonalen Kultur nur um die Hälfte kleiner, gravierende Unterschiede traten erst bei den freien Cytokinen auf. Eine erhöhte Biosynthese in proembryonalen Zellen ist somit nicht sehr wahrscheinlich, wohl aber eine verstärkte Degradation in den embryonalen Zellen. 2) geht man von einer reinen Degradation der t-RNA als Entstehung von Cytokinen aus, so ist ebenfalls ein erhöhter Um- und Abbau der embryonalen Cytokine anzunehmen, da durch t-RNA Abbau zunächst die Cytokinphosphate entstehen und dann erst die freien Cytokine auftreten.

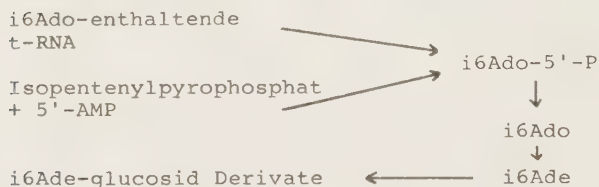
Durch exogene Applikation von Isopentenyladenosin und Isopentenyladenin konnte zusätzlich gezeigt werden, daß der Cytokineeinfluß primär auf der Zellteilungsebene stattfindet. Aus der Literatur war bekannt, daß hohe Cytokininkonzentrationen die Embryogenese hemmen (41,44). Dies konnte durch Applikation von 5×10^{-6} M Isopentenyladenosin/Isopentenyladenin zu der embryonalen Aniszellkultur (-2,4-D) bestätigt werden (Tabelle 19). Die Abnahme der inhibitorischen Wirkung im Verlauf der Inkubation muß auf einen verstärkten Abbau der zugesetzten Cytokine zurückgeführt werden, so daß das endogene Gesamtniveau auf

einen nicht mehr hemmenden Wert gefallen sein muß. Konzentrationen von 5×10^{-7} bis 5×10^{-8} M führten zu einer erhöhten Embryonenzahl. Ähnliches wurde von Fujimura für Karottenzellkulturen berichtet (41,42). Eine niedrige Konzentration von Isopentenyladenosin/Isopentenyladenin zu Beginn der Inkubation förderte also die Anzahl der später gebildeten Embryonen. Diese Vermutung wurde durch Applikation von Isopentenyladenosin/Isopentenyladenin zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion der Embryogenese bestätigt (Tabelle 20). Bis zum 3.Tag nach Embryogeneseinduktion konnte eine Steigerung der Embryonenzahl um 46% erreicht werden, wobei für den 2.Tag der höchste Wert gefunden wurde. Zugabe ab dem 4.Tag erbrachte keine Erhöhung der Embryonenzahl mehr. Hier besteht nun eine direkte Korrelation mit dem Maximum der endogenen Cytokininkonzentration, das ja auch zwischen dem 2. und 4. Tag nach Kulturbeginn aufgetreten war. Da der fördernde Einfluß von Isopentenyladenosin/Isopentenyladenin bereits vor der morphologisch sichtbaren Embryonenausbildung vorhanden war und auch das endogene Maximum der Cytokininaktivität vor der massiven Ausbildung von globulären Embryonen lag (Abb.14, Tabelle 7; Abb.20), kann die positive Wirkung von Cytokinen auf die Embryogenese durch einen verstärkten Effekt auf Zellteilungsvorgänge zurückgeführt werden. Nach Bennici et al.(44) ist der Einfluß von Cytokinen auf *Phaseolus coccineus* Embryonen auf eine Längenzunahme der Embryos zurückzuführen, so daß auch hier ein primärer Effekt auf das Zellwachstum vorhanden ist.

Nach Huber et al.(53) wurde die Anzahl der Embryonen in einer Aniszellkultur durch eine Erhöhung der Anfangszelldichte stark gesteigert. Vermehrte Zellteilungen nach Induktion der Embryogenese, bedingt durch appliziertes Cytokinin, ergaben somit eine erhöhte Zelldichte und nachfolgend eine Erhöhung der Embryonenzahl (Tabelle 20). Der fördernde Einfluß von Cytokinen auf die Zellteilungen konnte durch Kontrollversuche bestätigt werden. In einer proembryonalen Kultur (+ 2,4-D) wurde durch Zusatz von Isopentenyladenosin/Isopentenyladenin (5×10^{-7} - 5×10^{-8} M) eine erhöhte Zelldichte im Vergleich zu Kontrollzellen ohne exogene Cytokinine nach 2 Tagen gefunden. Die Steigerungsrate lag zwischen 24% und 46% (Tabelle 21). Nach 90 h war dieser Effekt mit ca. 10% nicht mehr so stark ausgeprägt, d.h.: die Kontrollzellen müssen eine erhöhte Zellteilungsrate gehabt haben. Die gefundenen Werte sind in guter Übereinstimmung mit denen von Mackenzie (77) für eine Berg-Ahornkultur, in der niedrige Cytokinapplikationen eine starke Erhöhung der Zelldichte bewirkten.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß Cytokine keinen direkten Einfluß auf die Embryogenese in Aniszellkulturen haben, sondern vielmehr einen positiven Effekt auf Zellteilungsvorgänge ausüben. Diese Wirkung der Cytokine ist damit unabhängig von der Embryogenese und auch bei proembryonalen Kulturen vorhanden. Die gefundenen unterschiedlichen Cytokinmengen in der proembryonalen, bzw. embryonalen Kultur lassen auf eine

erhöhte Rate des Cytokininmetabolismus der embryonalen Kultur schließen. Da das Auftreten von Isopentenyladenosin-Phosphaten der Bildung freier Cytokinine voranging, polare freie Cytokinine (z.B. Cytokininglucoside) dagegen erst zu einem späteren Zeitpunkt gefunden werden konnten (Tabelle 8, Abb.20), wird für den Metabolismus von Isopentenyladenin in Übereinstimmung mit Literaturberichten (74, Sektion 1) folgendes Schema angenommen:



(i6Ade=Isopentenyladenin, i6Ado=Isopentenyladenosin)

Da Cytokinine für die somatische Embryogenese in Aniszellen nicht maßgebend sind, erhebt sich die Frage nach dem möglichen Einfluß anderer Phytohormone auf die Embryogenese. Endogene Auxine haben vermutlich keine Wirkung auf die Embryogenese, da ihre Konzentration sowohl in einer Selleriekultur (61), als auch in einer Karottenzellkultur (96) während der Embryonalentwicklung auf einem niedrigen Niveau, ohne große Schwankungen lagen. Für Gibberelline konnte in Zusammenarbeit mit R.P.Pharis gezeigt werden, daß in dieser embryonalen Aniszellkultur (-2,4-D) hohe Spiegel an GA_4 und/oder GA_7 und sehr niedrige an GA_1 vorhanden sind. Umgekehrt zeigten proembryonale Kulturen (+2,4-D) hohe GA_1 -Werte und etwas geringere GA_4 und/oder GA_7 -Werte. Ferner metabolisierten Embryos GA_1 sehr schnell zu GA_4 und GA_8 -Glucosiden, im Gegensatz zu Proembryos (97,98). Da Gibberellinsäuren die Embryogenese hemmen (41,97), könnte dies darauf hindeuten, daß die Embryonalentwicklung in Aniszellkulturen durch hohe Niveaus an biologisch aktiven polaren GAS gehemmt ist und Entfernung von 2,4-D einen Abbau dieser GAS bedingt, der zu einem niedrigen GA -Niveau führt, so daß die Embryogenese stattfinden kann. Auch ein Einfluß von Abscisinsäure auf die Embryonalentwicklung ist denkbar. So konnte Kamada (100) eine Korrelation zwischen der Embryogenese und dem endogenen Abscisinsäuregehalt in einer Karottenzellkultur finden. Rajasekaran (99) berichtete über eine Abnahme des endogenen Abscisinsäuregehalts während der somatischen Embryogenese von Weinreben. In einer Selleriekultur (61) konnte dagegen keine Abscisinsäure während der Embryonalentwicklung gefunden werden.

Für weitere Studien über die Initiation und Entwicklung

von Embryos ist es daher notwendig, sämtliche endogenen Hormone, sowie ihre Biosynthese und Abbauprozesse an einem einheitlichen System zu erfassen.

Das in dieser Aniszellkultur identifizierte und auch mengenmäßig erfasste neue, natürliche Cytokinin (6-Benzylaminopurinribosid) wurde bezüglich seiner physiologischen Wirkung bereits im Zusammenhang mit den Resultaten diskutiert (siehe unter 3.4).

Die Untersuchungen über ein cytokininbindendes Protein ergaben für eine 80.000 x g Fraktion der Aniszellen eine cytokininbindende Stelle. Die Menge an absolut gebundener Radioaktivität war vergleichbar mit derjenigen in einer Fraktion aus Tabakzellen (72). Die aus dem "Scatchard-Plot" ermittelte Dissoziationskonstante von $8,3 \times 10^{-5}$ M deutet auf eine geringe Affinität von Cytokinen für diese Bindungsstelle hin. Der Wert entspricht jedoch anderen Dissoziationskonstanten für cytokininbindende Proteine mit einer geringen Bindungsaffinität ($7,7 \times 10^{-6}$ M aus Tabakzellen (72), 9×10^{-3} M aus Weizenkeimlingen (86), $6,4 \times 10^{-6}$ M aus Karottenzellen (48), 4×10^{-5} M aus Tabakblätter (71)). Da die endogene Cytokinkonzentration der Aniszellkultur im Bereich von 10^{-7} M - 10^{-9} M lag, ist es jedoch nicht sehr wahrscheinlich, daß diese Cytokininbindungsstelle einen Rezeptor für endogene Cytokine darstellt. Interessant ist jedoch, daß z.B. Rinderserumalbumin keine Bindung von 14 C-Benzylaminopurin zeigte (Abb.25). Ferner ergaben Spezifitätsuntersuchungen eine verminderte Kompetition von 9-ribosylierten Cytokinen und eine schwächere Bindung für Zeatin im Vergleich zu 6-Benzylaminopurin oder Isopentenyladenin (Tabelle 24). 9-ribosylierte Cytokine waren auch in einer Fraktion aus Tabakzellen (72) und *Funaria hygrometrica* Zellen (73), sehr schwache Kompetitoren. Im Gegensatz dazu zeigten sie jedoch bei unspezifischen Bindungsversuchen mit Talcum Puder eine wesentlich bessere Kompetition (73). Eine rein unspezifische Bindung von Cytokinen in dieser 80.000 x g Fraktion ist daher ausgeschlossen. Die schwächere Bindung von Zeatin wurde auch für andere cytokininbindende Proteine berichtet (Gardner, 73; Keim, 74). Dieses Verhalten von Zeatin ist nach Keim (74) auf die HO-Gruppe in der Seitenkette zurückzuführen. Die generelle Bedeutung der HO-Gruppe zeigte sich auch an den Kreuzreaktionen der Antikörper im RIA (Tabelle 5). Auch hier ergaben sich für Isopentenyladenosin- und Benzyladenosin-Antikörper gute Kreuzreaktionen mit Benzyladenosin, bzw. Isopentenyladenin, nicht dagegen mit Zeatin. Umgekehrt traf dies für Zeatinribosid-Antikörper ebenfalls zu.

Eine weitere Reinigung dieser 80.000 x g Fraktion durch

eine Affinitätschromatographie führte zu dem Verlust der Proteinbindungseigenschaft. Die Elution der Affinitätssäule mit hohen Ionenstärken könnte somit die Abtrennung von notwendigen Bindungsfaktoren verursacht haben.

Die SDS-Gel-Elektrophorese (9-18%) ergab mehrere Einzelbanden (Abb.29). Da die 3 Hauptbanden, im Molekulargewichtsbereich von 12.500 - 21.500 auch in der Überstandsfraktion vorkamen, scheiden sie als Komponenten eines Bindungsproteins aus. Für diese Banden war eine unspezifische Bindung an das Sepharose-Isopentenyladenosin-Gel anzunehmen. Zwischen Trypsin-Inhibitor (21.500) und Rinderserumalbumin (68.000) konnte jedoch eine schwache Anreicherung von 3 Banden in der Elutionsfraktion gefunden werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Durch den Aufbau eines cytokininautotrophen Aniszellkultur-System (Pimpinella anisum L.) konnte die Frage einer möglichen Beteiligung von Cytokinen an der Embryonalentwicklung geklärt werden.

Für die quantitative Bestimmung endogener Cytokine wurden 3 verschiedene Techniken benutzt: 1) der Bioassay, 2) der Radioimmunoassay (RIA) und 3) die Gaschromatographie/Massenspektroskopie (GC/MS) unter Verwendung von Einzelionen-Messungen. Der Bioassay erwies sich als nicht befriedigend, wohingegen die mengenmäßige Cytokininbestimmung durch den RIA und die GC/MS gut übereinstimmte.

Folgende Cytokine konnten sowohl in der proembryonalen, als auch der embryonalen Kultur erfasst werden : Isopentenyladenosin, Isopentenyladenin, polare Isopentenyladenine (z.B. Glucoside), Isopentenyladenosin-phosphate, Zeatin, Zeatinribosid / polare Zeatine (z.B. Glucoside) und Zeatinribosid-phosphate. Quantitative Bestimmungen ergaben einen größeren Anteil der Isopentenyladenin-Gruppe gegenüber der Zeatin-Gruppe (Faktor 2-5).

Sowohl in embryonalen, als auch proembryonalen Kulturen ergab sich ein Maximum der freien Cytokine während des logarithmischen Wachstums (für Isopentenyladenosin 4 ng/g Fg., bzw. 58,3 ng/g Fg.; für Isopentenyladenin 1,4 ng/g Fg., bzw. 7,9 ng/g Fg.; für Zeatin 3,6 ng/g Fg., bzw. 11,1 ng/g Fg.)

Eine Korrelation zwischen einzelnen Embryonalstufen und endogenen Cytokininaktivitäten wurde nicht gefunden, so daß ein direkter Einfluß von Cytokinen auf die Embryogenese ausgeschlossen werden konnte. Exogene Applikation von Isopentenyladenosin/Isopentenyladenin (5×10^{-7} - 5×10^{-8} M) führten in embryonalen Kulturen zu einer vermehrten Embryonenbildung, in proembryonalen Kulturen zu einer Erhöhung der Zelldichte. Auf Grund dieser Befunde, sowie der endogenen Maxima während der log-Phase des Wachstums war somit ein Einfluß von Cytokinen auf Zellteilungsvorgänge nachweisbar.

Da während des Zellwachstums die phosphorylierten Cytokinine der Bildung freier Cytokinine zeitlich vorausgingen und polare Cytokinine erst zu einem späteren Zeitpunkt auftraten, ergab sich für den Isopentenyladenin-Metabolismus folgendes Schema:

Isopentenyladenosin-phosphate $\longrightarrow$ Isopentenyladenosin $\longrightarrow$
 Isopentenyladenin $\longrightarrow$ polare Isopentenyladenine.

Im Verlauf dieser Untersuchung konnte ein neues, natürlich vorkommendes Cytokinin (6-Benzylaminopurinribosid) aus den Aniszellen extrahiert, identifiziert und quantifiziert werden.

Untersuchungen über ein cytokininbindendes Protein wiesen in einer 80.000 x g Fraktion eine cytokininbindende Aktivität nach. Die Dissoziationskonstante von $8,3 \times 10^{-5}$ M deutete auf eine niedrige Bindungsaffinität hin. Dennoch konnte durch Kompetitionsstudien mit verschiedenen Cytokinen eine gewisse Bindungsspezifität nachgewiesen werden. Ein weiterer Reinigungsschritt mit Hilfe einer Affinitätschromatographie reicherte 3 Proteine, sichtbar an Banden in der SDS-gelelektrophoretischen Auftrennung, an.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Haberlandt, J. (1912) Wundhormone als Erreger von Zellteilungen. *Allg. Bot.* 2, 1-53
- 2) Skoog, F., Tsui, C. (1948) Chemical control of growth and bud formation in tobacco stem segments and callus cultured in vitro. *Am. J. Bot.* 35, 782-787
- 3) Jablonski, J. P., Skoog, F. (1954) Cell enlargement and cell division in excised tobacco pith tissue. *Phys. Plant.* 7, 16-24
- 4) Miller, C. O., Skoog, F., Saltza, M. H., Strong, F. M. (1955) Kinetin a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 77, 1329
- 5) Miller, C. O., Skoog, F., Okumara, F. S., Saltza, M. H., Strong, F. (1955) Structure and synthesis of kinetin. *J. Am. Chem. Soc.* 77, 2662-2663
- 6) Skoog, F., Strong, F. M., Miller, C. O. (1965) Cytokinins. *Science* 148, 532-533
- 7) Letham, D. S. (1963) Inhibitors and stimulants of cell division in developing fruits: their properties and activity in relation to the cell division period. *N. Z. J. Bot.* 1, 336-350
- 8) Letham, D. S. (1963) Zeatin: a factor including cell division from *Zea mays*. *Life Sci.* 8, 569-573
- 9) Bearder, J. R. (1980) Plant hormones and other growth substances. In: *Hormonal regulation of development I Encyclopedia of plant physiology*, pp 9-80, ed. Mac Millan, J.; Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York
- 10) Kende, H. (1971) The cytokinins. In: *Int. Rev. Cyt.* 31, pp 301-338, ed. Bourne, G. H., Danielli, J. F.; Academic press New York, London
- 11) Wareing, P. F., Horgan, R., Henson, J. E., Davis, W. (1977) Cytokinin relations in the whole plant. In: *Plant growth regulation*, pp 147-153, ed. Pilet, P. F.; Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York
- 12) Horgan, R. (1978) Nature and distribution of cytokinins. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* 284, 439-447
- 13) Vonk, C. R. (1979) Origin of cytokinins transported in the phloem. *Phys. Plant.* 46, 235-240

- 14) Morris, R.O., Zaerr, J.B., Chapman, R.W. (1976) Trace enrichment of cytokinins from Douglas-fir xylem extrudate. *Planta* 131, 271-274
- 15) Hewett, E.W., Wareing, P.F. (1973) Cytokinins in *Populus robusta* Schneid.: a complex in leaves. *Planta* 112, 225-233
- 16) Nishinari, N., Syono, K. (1980) Changes in endogenous cytokinin levels in partially synchronized cultured tobacco cells. *Plant. Phys.* 65, 437-441
- 17) Linstedt, D., Reinert, J. (1975) Occurrence and properties of a cytokinin in tissue culture of *Daucus carota*. *Naturwissenschaften* 62, 238-239
- 18) Short, C.K., Torrey, J. (1972) Cytokinin production in relation to the growth of pea-root callus tissue. *J. Exp. Bot.* 23, 1099-1105
- 19) Mackenzie, I.A., Street, H.E. (1972) The cytokinins of cultured sycamore cells. *New Phytol.* 71, 621-631
- 20) Weiler, E.W., Spanier, K. (1981) Phytohormones in the formation of crown gall tumors. *Planta* 153, 326-337
- 21) Phillips, D.A., Torrey, J.G. (1970) Cytokinin production by *Rhizobium japonicum*. *Phys. Plant.* 23, 1057-1063
- 22) Schraudolph, H., Fischer, A. (1979) Evidence for cytokinins in gametophytes of the fern *Anemica phyllitidis* L. *Plant. Sci. Lett.* 14, 199-203
- 23) Wang, L.T., Cove, D.J., Beutelmann, P., Hartmann, E. (1980) Isopentenyladenin from mutants of the moss *Physcomitrella patens*. *Phytochem.* 19, 1103-1105
- 24) Keutzer, T., Synak, R., Burkiewicz, K., Banas, A. (1980) Cytokinin-like activity in sea water and *Fucus vesiculosus* L. *Biol. Plant.* 22, 218-225
- 25) Letham, D.S. (1978) Cytokinins. In: *Phytohormones and related compounds*, pp 205-251, ed. Letham, D.S., Goodwin, P.B., Higgins, T.J.V.; Elsevier/North-Holland
- 26) Stoddart, J.L., Venis, M.A. (1980) Molecular and sub-cellular aspects of hormone action. In: *Hormonal regulation of development I*, *Encyclopedia of plant physiology*, pp 445-501, ed. Mac Millan, J.; Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York
- 27) Skoog, F., Miller, C.O. (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11, 118-131

- 28) Green,E.M.(1980) Cytokinin production in microorganism.
In: The Botanical Review, Vol.46, pp 25-74
- 29) Gresshoff,P.M.(1978) Phytohormones and growth and
differentiation of cells and tissue cultured in vitro.
In: Phytohormones and related compounds vol.II, pp 1-22
ed. Letham,D.S., Goodwin,P.B., Higgins,T.J.V.;
Elsevier/North-Holland
- 30) Harrison,M.A.,Kaufman,P.B.(1980) Hormonal regulation of
lateral bud release in oats.Plant.Physiol.66, 1123-1127
- 31) Dalessandro,G.(1973)Interaction of auxin, cytokinin and
gibberellin on cell division and xylem differentiation
in cultured explants of Jerusalem artichoke.
Plant&Cell Physiol.14, 1167-1176
- 32) Shininger,T.L.(1978) Hormone regulation of development
in plant cells. In vitro 14, 31-50
- 33) Daniell,H.,Rebeiz,C.A.(1982) Chloroplast culture VIII.
Biochem.Biophys.Res.Comm.104, 837-843
- 34) Dauphin-Guerin,B.,Teller,G.,Durand,B.(1980) Different
endogenous cytokinins between male and female
Mercurialis annua L. Planta 148, 124-129
- 35) Nooden,L.D.,Leopold,A.C.(1978) Phytohormones and the
endogenous regulation of senescence and abscission.
In: Phytohormones and related compounds vol.II, pp 329-
357, ed. Letham,D.S., Goodwin,P.B., Higgins,T.J.V.;
Elsevier/North-Holland
- 36) Black,M.(1981) The role of endogenous hormones in
germination and dormancy. Israel J.Bot.29, 181-192
- 37) Pinfield,N.J.,Davis,H.V.(1978) Hormonal changes during
after-ripening of *Acer platanoides* L. seeds.
Z.Pflanzenphysiol.90, 171-181
- 38) Smith,A.R.,Van Staden,J.(1978) Changes in endogenous
cytokinin levels in kernels of *Zea mays* L. during
imbibition and germinating. J.Exp.Bot.29, 1067-1075
- 39) Lorenzi,R.Bennici,A.,Cionini,P.G.,Alpi,A.,D'Amato,F.
(1978)Embryo-Suspensor relations in *Phaseolus coccineus*
cytokinins during seed development. Planta 143, 59-62
- 40) Smith,A.R.,Van Staden,J.(1978) Cytokinins in excised
embryos and endosperm of *Zea mays* L. grown under
aseptic conditions Z.Pflanzenphysiol.93, 95-103
- 41) Fujumura,T.,Komamine,A.(1975) Effects of various growth
regulators on the embryogenesis in a carrot cell
suspension culture. Plant.Sci.Let.5, 359-364

- 42) Fujumura, T., Komamine, A. (1980) Mode of action of 2,4-D and zeatin on somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *Z. Pflanzenphysiol.* 99, 1-8
- 43) Ernst, D. (1979) Vorkommen von Cytokinin während der Embryogenese in Suspensionskulturen von Aniszellen. Diplomarbeit. Universität München
- 44) Bennici, A., Cionnini, P.G. (1979) Cytokinins and in vitro development of *Phaseolus coccineus* embryos. *Planta* 147, 27-29
- 45) Biddington, N.L., Thomas, T.H. (1973) A modified *Amaranthus* Betacyanin Bioassay for the rapid determination of cytokinins in plant extracts. *Planta* 111, 183-186
- 46) Schröter, R. (1957) Reduktion von Nitrilen zu Aminen. In: Houben/Weyl Methoden der organischen Chemie, XI/1, pp 545-574, ed. Müller, E.; Thieme-Verlag, Stuttgart
- 47) Weiler, E.W., Zenk, M.H. (1976) Radioimmunoassay for the determination of digoxin and related compounds in *Digitalis lanata*. *Phytochem.* 15, 1537-1545
- 48) Kobayashi, K., Zbell, B., Reinert, J. (1981) A high affinity binding site for cytokinin to a particulate fraction in carrot suspension cells. *Protoplasma* 106, 145-155
- 49) Cuatrecasas, P., Anfinson, C.B. (1971) Affinity chromatography. In: *Methods in enzymology* vol. XXII, pp 345-385, ed. Jakoby, W.B.; Academic Press, New York-London
- 50) Inman, J. (1974) Covalent linkage of functional groups, ligands and proteins to polyacrylamide beads. In: *Methods in enzymology* vol. XXXIIIV, pp 30-58, ed. Jakoby, W.B., Wilchek, M.; Academic Press
- 51) Erion, J.L., Fox, J.E. (1981) Purification and properties of protein which binds cytokinin-active 6-substituted purines. *Plant Physiol.* 67, 157-162
- 52) Gamborg, O.L., Wetter, L.R. (1975) Plant tissue culture methods, publ. National Research Council of Canada, Saskatoon
- 53) Huber, J., Constabel, F., Gamborg, O.L. (1978) A cell counting procedure applied to embryogenesis in cell suspension cultures of anise. *Plant. Sci. Lett.* 12, 209-215
- 54) Chen, C., Melitz, D.K., Petschow, B., Eckert, R.L. (1980) Isolation of a cytokinin-binding protein from plant tissue by affinity chromatography. *Eur. J. Biochem.* 108, 379-387

- 55) Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- 56) Bradford, M.M. (1976) Protein assay by dye binding. *Analyt. Biochem.* 72, 248-254
- 57) Breton, A.M., Sung, Z.R. (1982) Temperature-sensitive carrot variants impaired in embryogenesis. *Developmental Biology* 90, 58-66
- 58) Smith, M.S., Street, H.E. (1974) Decline of embryogenic potential as callus and suspension cultures of carrot are serially subcultured. *Ann. Bot.* 38, 223-241
- 59) Bigot, C. (1968) Action d'adenines substituées sur la synthèse des betacyanines dans la plantule d'*Amaranthus caudatus* L. *C.R. Acad. Sc., Paris*, t. 266, Serie D, 349-352
- 60) Biddington, N.L., Thomas, T.H. (1977) Interactions of ABA, cytokinin and gibberellin in the control of betacyanin synthesis in *Amaranthus caudatus*. *Phys. Plant.* 40, 312-314
- 61) Al-Abta, S., Collin, H.A. (1979) Endogenous auxin and cytokinin changes during embryoid development in cellery tissue culture. *New Phyt.* 82, 29-35
- 62) Weiler, E.W. (1980) Radioimmunoassay for trans-zeatin and related cytokinins. *Planta* 149, 155-162
- 63) Mac Donald, M.S., Akiyoshi, D.E., Morris, R.O. (1981) Combined HPLC/RIA for cytokinins. *J. Chrom.* 214, 101-109
- 64) Chard, T. (1978) An introduction to radioimmunoassay and related techniques. In: *Laboratory techniques*, ed. Work/Work; North-Holland, Amsterdam, New York, Oxford
- 65) Chervu, L.R., Murty, D.R.V. (1975) Radiolabeling of antigens, pp 33-48. In: *Radioimmunoassay*, ed. Freeman, Blaufox; Grune and Stratton, New York, San Francisco, London
- 66) Hashizume, T., Sagiyuma, T., Imwra, M., Cory, H.T., Scott, M.F., McCloskey, J.A. (1979) Determination of cytokinins by mass spectrometry based on stable isotope diluting. *Anal. Biochem.* 92, 111-122
- 67) Summons, R.E., MacLeod, J.K., Porter, C.W., Letham, D.S. (1977) The occurrence of raphanitin as an endogenous cytokinin in radish seeds. *FEBS Lett.* 82, 211-214
- 68) Palmer, M.V., Horgan, R., Wareing, P.F. (1981) Cytokinin metabolism in *Phaseolus vulgaris*. *Planta* 153, 297-302

- 69) Noma, M., Huber, J., Pharis, R.P. (1979) Occurrence of $\Delta^1(10)$ gibberellin A₁ counterpart, GA₁, GA₄, and GA₇ in somatic cell embryo cultures of carrot and anise. *Agric. Biol. Chem.* 43, 1793-1794
- 70) Moore, F.H. (1979) A cytokinin binding protein from wheat germ. *Plant Physiol.* 64, 594-599
- 71) Yoshida, K., Takegami, T. (1977) Isolation of cytokinin binding protein from tobacco leaves by bioaffinity chromatography and its partial characterization. *J. Biochem.* 81, 791-799
- 72) Sussman, M.R., Kende, H. (1978) In vitro cytokinin binding to a particulate fraction of tobacco cells. *Planta* 140, 251-259
- 73) Gardner, J., Sussman, M.R., Kende, H. (1978) In vitro cytokinin binding to a particulate cell fraction from protonema of *Funaria hygrometrica*. *Planta* 143, 67-73
- 74) Metabolism and molecular activities of cytokinins (1981). ed. Guern, J., Deaud-Lenoel, C., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- 75) Horgan, P. (1978) Analytical procedures for cytokinins. In: Isolation of plant growth substances, pp 97-114, ed. Hillman, J.R.; Cambridge University Press
- 76) Vreman, J.H., Corse, J. (1975) Recovery of cytokinins from cation exchange resins. *Physiol. Plant.* 35, 333-336
- 77) Mackenzie, I.A., Konar, A., Street, H.E. (1972) Cytokinins and growth of cultured sycamore cells. *New Phytol.* 71, 633-638
- 78) Horgan, R., Hewett, E.W., Horgan, J.M., Purse, J., Wareing, P.F. (1975) A new cytokinin from *Populus robusta* *Phytochemistry* 14, 1005-1008
- 79) Chaves das Neves, H.J., Pais, M.S. (1980) A new cytokinin from the fruits of *Zantedeschia aethiopica*. *Tetrahedron Lett.* 21, 4387-4390
- 80) Scatchard, G. (1949) The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51, 660-672
- 81) Martin, G.C., Horgan, R., Scott, I.M. (1981) High performance liquid chromatographic analysis of permethylated cytokinins. *J. Chrom.* 219, 167-170
- 82) Scott, I.M., Martin, G.C., Horgan, R., Heald, J.K. (1982) Mass spectrometric measurement of zeatin glycoside levels in *Vincea rosea* L. crown gall tissue. *Planta* 154, 273-274

- 83) Saunders, M.J., Hepler, P.K. (1982) Evidence for cytokinin regulation of mitosis mediated by calcium. 11th international conference on plant growth substances. Aberystwyth, Wales
- 84) Kemp, T.R., Stolz, L.R. (1979) Cytokinins from growth regulator autonomous callus tissue. *Plant Sci. Lett.* 16, 403-408
- 85) Fosket, D.E., Tepper, D.A. (1978) Hormonal regulation of growth in cultured plant cells. *In Vitro* 14, 63-75
- 86) Fox, J.E., Erion, J.L. (1975) A cytokinin binding protein from higher plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 64, 694-700
- 87) Chen, C.M., Hartnell, G.F., Smith, O.C., Francis, W.S. (1974) Quantitative measurements of hypermodified adenine ribonucleosides in plant tissue. *Analyt. Biochem.* 60, 441-448
- 88) Edwards, C.A., Armstrong, D.J. (1981) Cytokinin-active ribonucleosides in Phaseolus RNA. *Plant. Physiol.* 67, 1181-1189
- 89) Klemen, F., Klämbt, D. (1974) Half-life of sRNA from primary roots of Zea mays. A contribution to the cytokinin production. *Physiol. Plant.* 31, 186-188
- 90) Chen, C.M., Eckert, R.L., Mc Chesney, J.D. (1976) Evidence for the biosynthesis of transfer RNA-free cytokinin. *FEBS Lett.* 64, 429-434
- 91) Burrow, W.J. (1978) Incorporation of ^3H -adenine into free cytokinins by cytokinin-autonomous tobacco callus tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 84, 743-748
- 92) Taya, Y., Tanaka, Y., Nishimura, S. (1978) 5'-AMP is a direct precursor of cytokinin in *Dictyostelium discoideum*. *Nature* 271, 545-547
- 93) Gasque, C.E. (1982) Comparison of cytokinin activities of 9-substituted N⁶-benzyladenines in the cucumis and amaranthus bioassay. *Phytochem.* 21, 1501-1507
- 94) Huber, J. pers. Mitt.
- 95) Jayabaskaran, C., Jacob, T.M. (1982) Isolation and estimation of cytokinins and cytokinin-containing transfer RNAs from cucumis sativus L. var. Guntur seedlings. *Plant. Physiol.* 70, 1396-1400
- 96) Fujumura, T., Komamine, A. (1979) Involvement of endogenous auxin in somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *Z. Pflanzenphysiol.* 95, 13-19

- 97) Noma, M., Huber, J., Ernst, D., Pharis, R.P. (1982) Quantitation of gibberellins and the metabolism of ^3H -gibberellin A_1 during somatic embryogenesis in carrot and anise cultures. *Planta* 155, 369-376
- 98) Koshioka, M., Douglas, T.J., Ernst, D., Huber, J., Pharis, R.P. (1983) Metabolism of ^3H -gibberellin A_1 in somatic suspension cultures of anise. *Phytochem.* 22, 1577-1584
- 99) Rajasekaran, K., Vine, J., Mullis, M.J. (1982) Dormancy in somatic embryos and seeds of *Vitis*: changes in endogenous abscisic acid during embryogeny and germination. *Planta* 154, 139-144
- 100) Kamada, H., Harada, H. (1981) Changes in the endogenous level and effects of abscisic acid during somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. *Plant & Cell Physiol.* 22, 1423-1429
- 101) Hashizume, T., McCloskey, J.A. (1976) Electron impact-induced reactions of N⁶-(3-methyl-2-butenyl)adenosine and related cytokinins. *Biom. Mass Spectrom.* 3, 177-183
- 102) Rice, J.M., Dudek, G.O. (1967) Mass spectra of nucleic acid derivatives. II. Guanine, adenine, and related compounds. *J. Am. Chem. Soc.* 89, 2719-2725
- 103) The Merck Index, ninth edition (1979); ed. M. Windholz Merck & Co, Inc.
- 104) Hall, R.H., Robins, M.J. (1968) N-(3-Methyl-2-butenyl)-adenine. In: *Synthetic procedures in nucleic acid chemistry*, vol. 1, pp 11-12; ed. Zorbach, W.W., Tibson, R.S. Interscience publishers, New York, London, Sydney, Toronto
- 105) Schomburg, G. (1977) *Gaschromatographie*, ed. Fahr, E.; Verlag Chemie, Weinheim
- 106) Dörffling, K. (1982) *Das Hormonsystem der Pflanzen*; Thieme Verlag, Stuttgart-New York
- 107) Gilbert, M.L., Thompson, J.E., Dumbroff, E.B. (1980) Delayed cotyledon senescence following treatment with a cytokinin: an effect at the level of membranes. *Can. J. Bot.* 58, 1797-1803

Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung für Membranbiochemie, unter der Leitung von Prof.Dr.D.Oesterhelt durchgeführt.

Herrn Prof.Dr.D.Oesterhelt danke ich sehr herzlich für sein persönliches Interesse an allen wissenschaftlichen und persönlichen Belangen, sowie für seine Ratschläge und ständige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof.Dr.W.Schäfer danke ich für die Durchführung der GC/MS Messungen, sowie für seine Diskussionsbeiträge.

Frau G.Schild möchte ich für die Aufnahme der NMR-Spektren danken.

Herrn Dr.H.Lemke bin ich für die Einführung in die HPLC-Technik dankbar.

Herrn Prof.Dr.P.Dittrich danke ich für die Vertretung dieser Arbeit bei der Fakultät für Biologie.

Lebenslauf

Name : Dietrich ERNST

geboren : 4. Mai 1951

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand : verheiratet

Schulbildung : 4 Jahre Volksschule
9 Jahre math.-naturwiss. Gymnasium

Zivildienst : 16 Monate

Studium : 5 Jahre Biologie/Diplom an der Ludwig-
Maximilians-Universität München
Diplom 1979 in Botanik, Biochemie und
Mikrobiologie

Seit 1980 Doktorand am MPI f. Biochemie in Martinsried

